Versuche zur in vitro-Messung der Proteinsynthese einzelner Zellfraktionen (Mitochondrien, Mikrosomen und Zellkerne) in Gegenwart anderer Zellpartikel

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Behm

aus Meiningen/Thür.

1976

Versuche zur in vitro-Messung der Proteinsynthese einzelner Zellfraktionen (Mitochondrien, Mikrosomen und Zellkerne) in Gegenwart anderer Zellpartikel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

LIBRARY
CLINICAL
RSH

vorgelegt von

Wolfgang Behm
aus Meiningen / Thür.

Referent: Prof. Dr. D. Neubert
Korreferent: Prof. Dr. A. Gräßmann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am 24.5.1976

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Abt. Embryonalpharmakologie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0061

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung	1
3.	Theoretischer Teil	2
3.1.	Allgemeines über die Protein-Biosynthese	2
3.2.	Hemmung definierter Schritte der Proteinsynthese durch Antibiotika	4
3.2.1.	Puromycin	4
3.2.2.	Chloramphenicol	5
3.2.3.	Cycloheximid	6
4.	Material und Methoden	7
4.1.	Benutzte Substanzen	7
4.2.	Präparationsmedien	7
4.3.	Versuchstiere	8
4.4.	Technik der Homogenatgewinnung und Isolierung der einzelnen Zellfraktionen mit Hilfe der Differentialzentrifugation	9
4.4.1.	Gewinnung des Leber-Homogenates	9
4.4.2.	Gewinnung des postnuclearen Überstandes	9
4.4.3.	Isolierung der Leber-Mikrosomen	9
4.4.4.	Isolierung der Zellkernfraktion	11
4.4.5.	Isolierung der Mitochondrienfraktion	13
4.4.6.	Hyaloplasma	16
4.4.7.	Gewinnung einer pH 5-Enzymfraktion aus Gehirnhyaloplasma	16
4.5.	Ansätze zur Messung der Proteinsynthese	16
4.6.	Durchführung der Inkubation und Waschvorgang	18
4.7.	Beschreibung der Vorinkubation	19
4.8.	Messung der Radioaktivität und Bestimmung der Zählausbeute	20
4.9.	Quantitative Proteinbestimmung	21
4.10.	RNA-Bestimmung	22
4.11.	DNA-Bestimmung	22

		Seite
4.12	Cytochromoxydase-Bestimmung	23
5.	Ergebnisse und Diskussion	24
5.1.	Versuche mit postnuclearem Überstand	24
5.1.1.	Abhängigkeit der Proteinsynthese-Aktivität von der eingesetzten Menge Gewebe	24
5.1.2.	Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese	26
5.1.3.	Einfluß von Puromycin, Chloramphenicol und Cycloheximid auf die in vitro Proteinsynthese	26
5.2.	Versuche mit Mikrosomen, Mitochondrien und Zellkernen aus Leber-Homogenaten	29
5.2.1.	Zeit- und Fermentabhängigkeit der Proteinsynthese mit Zellkernen, Mikrosomen und Mitochondrien	30
5.2.1.1.	Zellkerne	30
5.2.1.2.	Mikrosomen	31
5.2.1.3.	Mitochondrien	33
5.2.2.	Inkubation von Zellkernen und Mikrosomen in einem Versuchsansatz	35
5.2.2.1.	Freisetzung von RNA aus isolierten Zellkernen	35
5.2.2.2.	Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Zellkerne, Mikrosomen sowie Zellkerne + Mikrosomen	36
5.2.3.	Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Mitochondrien, Zellkerne sowie Zellkerne + Mitochondrien	40
5.2.4.	Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Mikrosomen, Mitochondrien sowie Mikrosomen + Mitochondrien	43
5.2.5.	Hemmung der Proteinsynthese-Aktivität isolierter Zellpartikel durch Puromycin	46
5.2.6.	Einfluß verschiedener Mengen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit Mikrosomen	47
5.2.7.	Einfluß verschiedener Mengen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit Zellkernen	49

Seite

5.2.8. Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese durch Chloramphenicol und Cycloheximid 51

5.2.9. Einfluß von Hyaloplasma auf die mitochondriale Proteinsynthese; Hemmung durch Chloramphenicol und Cycloheximid 53

5.2.10. Einfluß von Saccharose-Hyaloplasma auf die mikrosomale Proteinsynthese; Vergleich zweier Suspensionsmedien für Mikrosomen 57

5.2.11. Versuch zur Messung von mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität aus einem von diesen Zellpartikeln zusammengesetzten "Homogenat" 60

5.3. Messung von mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität aus postnuclearem Überstand unter Verwendung der differenzierenden Hemmstoffe Chloramphenicol und Cycloheximid 63

6. Schlußfolgerungen 67

7. Zusammenfassung 72

Abkürzungen 74

Literaturverzeichnis 75

Lebenslauf 83

1. Einleitung

Die überwiegende Anzahl biochemischer Reaktionen in der lebenden Zelle wird durch Biokatalysatoren ermöglicht, die Eiweißcharakter haben und Fermente oder Enzyme genannt werden. Deshalb kommt der Synthese dieser Proteine in der Zelle eine zentrale Bedeutung zu.
Proteine sind Polypeptide, deren Bausteine Aminosäuren sind. Mit Hilfe geeigneter Inkubationsmedien, gereinigter Zellfraktionen sowie radioaktiv markierter Aminosäuren sind in vitro-Systeme entwickelt worden, die einen Einblick in den Mechanismus der Protein-Biosynthese gestatten. Die komplizierten Synthese-Vorgänge sind heute bei Prokaryonten weitgehend untersucht und aufgeklärt, und auch bei Eukaryonten konnten im letzten Jahrzehnt wesentliche Informationen gesammelt werden.

2. Problemstellung

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit Translationsvorgängen im embryonalen Säugetiergewebe und deren Beeinflussung durch Pharmaka. Die Phase der Organogenese ist durch eine Vielzahl von Differenzierungsvorgängen und ein außerordentlich schnelles Wachstum gekennzeichnet.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur direkten Messung der Proteinsynthese-Aktivität einzelner Zellfraktionen (Mikrosomen, Mitochondrien, Kerne) in Homogenaten embryonalen Gewebes zu entwickeln, die es erlaubt, auf die bisher angewandte verlustreiche Zellfraktionierung zu verzichten. Zur Messung der Proteinsynthese-Aktivität von Zellpartikeln in Gegenwart anderer Zellfraktionen bietet sich einmal die Anwendung differenzierender Hemmstoffe der Proteinsynthese an; zum anderen haben wir versucht, den Aminosäureeinbau in Proteine der verschiedenen Kompartements kinetisch (durch Aufzeichnung von Zeitkurven) voneinander abzugrenzen.

Für alle Versuchsreihen wurde Lebergewebe von Ratten benutzt, da zur Erstellung der Methode die Verwendung von embryonalem Gewebe ungerechtfertigt teuer und aufwendig erschien.

3. Theoretischer Teil

3.1. Allgemeines über die Protein-Biosynthese

Aus der sehr umfangreichen Literatur über die Proteinsynthese soll hier nur auf den eigentlichen Synthesevorgang etwas näher eingegangen werden.
Ausführlicher werde ich die möglichen Hemmungsvorgänge der Translation durch Antibiotika beschreiben, da dies für die Problemstellung dieser Arbeit wichtig erscheint.
Die heutigen Erkenntnisse über den Ablauf der Proteinsynthese wurden vorwiegend aus Untersuchungen mit zellfreien Bakteriensystemen gewonnen.
Danach läßt sich der Synthese-Vorgang in mehrere Schritte unterteilen. Bevor Aminosäuren zur Polypeptidsynthese verwendet werden können, müssen sie esterartig an das 3'-terminale Adenosin einer für jede Aminosäure spezifischen transfer-RNA (t-RNA) gebunden werden. Diese Bindung erfolgt durch "aktivierende Enzyme", die Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen, unter Mitwirkung von ATP im Cytosol.
Syntheseort der Polypeptide sind die Ribosomen, welche im Cytoplasma von Prokaryonten in Form der 30S und 50S Untereinheiten dissoziiert vorliegen. Zur Einleitung der Proteinsynthese muß ein Komplex ("initiation complex") aus messenger RNA, - sie determiniert die Reihenfolge der miteinander zu verknüpfenden Aminosäuren - einer kleinen 30S Ribosomenuntereinheit und der Formyl-methionyl-t-RNA unter Mitwirkung spezifischer Initiationsfaktoren gebildet werden (CLARK & MARCKER 1966; GHOSH et al. 1967; NOMURA et al. 1967), an den sich eine große 50S Untereinheit anlagert. Auf diese Weise entsteht ein vollständiges 70S Ribosomenpartikel mit dem zur Peptidverknüpfung erforderlichen enzymatischen Apparat.

Ähnlich scheint die mitochondriale Proteinsynthese bei Warmblütlern, die nach heutiger Auffassung an Ribosomen vom 55S-Typ abläuft (O'BRIEN and KALF 1966), sowie die Proteinsynthese bei Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums von Eukaryonten (80S Partikel) eingeleitet zu werden, wenn hier auch längst nicht alle Schritte so wie bei Bakterien bekannt sind.
Die F-met-t-RNA wird bei Bakterien nach unseren heutigen Erkenntnissen zuerst an die hypothetische A-site (aminoacyl-site) des 70S Ribosoms gebunden (GHOSH et al. 1967; KOLAKOFSKY et al. 1968; KONDO et al. 1968; SARKAR and THACH 1968).Hierbei treten 3 bestimmte Basen (Codon) der am Ribosom anhaftenden m-RNA in eine spezifische Wechselwirkung mit einem Basentriplet (Anticodon) der F-met-t-RNA. Das Enzym Translocase bewirkt über eine Konformationsänderung des Ribosoms den Weitertransport der F-met-t-RNA an die ebenfalls hypothetische P-site (peptidyl-site); die hierzu erforderliche Energie wird durch eine GTP-Spaltung gewonnen (BROT et al. 1968; ERBE and LEDER 1968; ERTEL et al. 1968; HAENNI and LUCAS-LENARD 1968; PESTKA 1968; TANAKA et al 1968). An der jetzt freigewordenen A-site des Ribosoms wird nun ein weiteres Codon der m-RNA durch das Anticodon einer passenden Aminoacyl-t-RNA besetzt. Die beiden an der A-site bzw. P-site gebundenen t-RNA-Moleküle sind räumlich so angeordnet, daß ihre Aminosäuren durch das Enzym Peptidsynthetase miteinander verknüpft werden können. Erneute Translocaseeinwirkung bewegt nun den m-RNA-t-RNA-Peptidkomplex um die Länge eines Codons am Ribosom weiter. Gleichzeitig wird mittels eines"protein-release-factor R" die Esterbindung zwischen Formyl-methionin als "Start"-Aminosäure und ihrer t-RNA gespalten, welche dann über eine weitere hypothetische Austrittsstelle ("exit site") vom Ribosom ins Cytoplasma gelangt. Dieses Zusammenspiel von Translocase und Peptidsynthetase wiederholt sich solange, bis an der A-site des Ribosoms ein Basentriplet der m-RNA erscheint, welches keine Aminosäure codiert (Nonsense Codon). Derartige Triplets werden im Zusammenhang mit ihrer "Stop"-Funktion bei der Polypeptidsynthese auch Terminator-Codons genannt. In einigen Bakterienarten fungieren UAA, UAG und UGA als Terminator-Codons (BRENNER et al. 1965; TAKANAMI

et al. 1965; WEIGERT and GAREN 1965; BRENNER et al. 1967; SAMBROOCK et al. 1967; WEIGERT et al. 1967) und leiten somit die Ablösung der Polypeptidkette vom Ribosom ein. Erst nach erfolgter Abspaltung der letzten Aminosäure von ihrer spezifischen t-RNA (protein-release-factor R) erfolgt die Ausbildung der für die Funktion eines Proteins erforderlichen spezifischen Struktur. Abschließend dissozieren die freien 70S Ribosomen in ihre 30S und 50S Untereinheiten (SUBRAMANIAN et al. 1968), um zur erneuten Proteinsynthese, auch mit anderem messenger, zur Verfügung zu stehen.

3.2. Hemmung definierter Schritte der Proteinsynthese durch Antibiotika

3.2.1. Puromycin

Es gibt eine ganze Reihe Antibiotika, die die Wirkung der Peptidsynthetase bei der Proteinsynthese beeinträchtigen. Bei ihrer Entdeckung in Escherichia-coli-Ribosomen durch MONRO 1967 wurde erkannt, daß die Peptidsynthetase ein Bestandteil der größeren 50S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms vom 70S-Typ ist (MONRO et al. 1967; MADEN et al. 1968).
Das Antibiotikum Puromycin wurde häufig verwendet, um den Mechanismus der Peptidbindung bei der Proteinsynthese näher zu untersuchen.

Abbildung 1 zeigt die Struktur, zum Vergleich ist daneben der "obere" Teil der Tyrosin- bzw. Phenylalanin-t-RNA Struktur abgebildet.

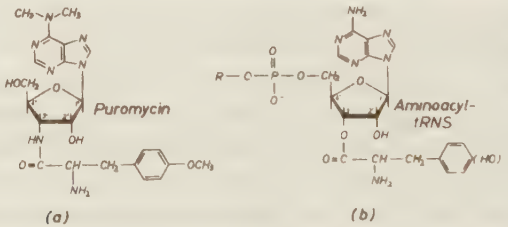


Abb.1 Strukturvergleich zwischen Puromycin (a) und Tyrosin- bzw. Phenylalanin-t-RNA (b)

Infolge der strukturellen Ähnlichkeit verdrängt Puromycin die Aminoacyl-t-RNA von der hypothetischen A-site des Ribosoms und geht mit der vorangehenden Aminosäure eine Peptidbindung ein. Mit der nachfolgenden Aminosäure ist keine Peptidverknüpfung mehr möglich, die bis dahin gebildete Peptidkette wird zusammen mit dem Antibiotikum freigesetzt (NATHANS 1964; GILBERT 1963). Diese Hemmung der Peptidsynthetase-Reaktion ist eine der wirksamsten Mechanismen für die Blockierung jeder Proteinsynthese.

3.2.2. Chloramphenicol

Chloramphenicol (CAP) ist ein Antibiotikum aus Streptomyces venezuelae. EHRLICH und Mitarbeiter erkannten 1947 die vielseitige Verwendbarkeit dieser Substanz als Bakteriostatikum. In der Folgezeit wurde Chloramphenicol mit hervorragendem Erfolg z.B. zur Bekämpfung des Typhus abdominalis eingesetzt; beträchtliche Nebenwirkungen auf das hämatopoetische System - Hemmung der Erythropoese im Knochenmark - sind seit langem bekannt (VOLINI et al. 1949; CLAUDON and HOLBROOK 1952).

Wirkmechanismus von Chloramphenicol: als Erster berichtete MAGER 1960 über den Einfluß von Chloramphenicol auf die Proteinsynthese von Mitochondrien aus Tetrahymena pyriformis. Er beobachtete in vitro eine starke Hemmung des Aminosäureeinbaues in Protein bei Anwesenheit dieser Substanz; auch die ähnlich wie in Mitochondrien ablaufende Proteinsynthese bei Bakterien ist hoch empfindlich gegen Chloramphenicol (TISSIERES et al. 1960; NIRENBERG and MATTHAEI 1961).

PONGS et al. gelang es im Frühjahr 1973 in Escherichia coli-Ribosomen ein Protein zu identifizieren, welches als Bindungsort für Chloramphenicol angesehen werden kann. Danach bindet sich Monojodamphenicol, ein synthetisches Analoges von CAP, zu 90 % an das Protein L 16 der 50S Untereinheit des Ribosoms vom 70S-Typ; 10% der markierten Substanz fand man an die Proteine L 6 sowie L 24 gebunden wieder. Mit steigender Inkubationstemperatur läßt sich auch eine geringe Affinität zur Bindung an das Protein S 18 der 30S Untereinheit des Ribosoms nachweisen. In Übereinstimmung mit

diesen Resultaten fanden NIERHAUS, D. und NIERHAUS, K. (1973), daß Chloramphenicol nur dann an die 50S Untereinheit eines bakteriellen Ribosoms vom 70S-Typ gebunden wird, wenn das Protein L 16 vorhanden ist.
Diese Bindung von Chloramphenicol an das L 16-Protein verhindert die Anlagerung von messenger RNA an die Ribosomen (PONGS et al. 1973); ein weiterer Effekt ist die Unterdrückung der Aktivität der Peptidsynthetase (FERNANDEZ-MUNOZ et al. 1971). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Chloramphenicol die Proteinsynthese von Mitochondrien und Bakterien hemmt, die cytoplasmatische Proteinsynthese an Warmblüterribosomen vom 80S-Typ jedoch nicht beeinflußt (LAMB et al. 1968).Eine Hemmung auch der Proteinsynthese an 80S-Ribosomen wurde bisher nur von WEISBERGER et al. (1963) beschrieben. Dieser Befund soll für die cytoplasmatische Proteinsynthese nicht-ausgereifter Zellen (Kaninchen-Retikulozyten) bei Verwendung eines exogenen "messengers" gelten. In unserem Labor konnte UEHLIN (1975) diese Befunde nicht bestätigen. Bei seinen Versuchen mit Ribosomen von Rattenembryonen unter Verwendung des exogenen "messengers" Poly-Uridylsäure (poly-U) konnte die in vitro-Proteinsynthese durch Chloramphenicol nicht gehemmt werden.

3.2.3. Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Antibiotikum aus Streptomyces griseus. Soweit heute bekannt ist, greift Cycloheximid in die Translocase-Reaktion ein. Vermutlich hemmt die Substanz die Weiterbewegung des Ribosoms um ein Basentriplet an der messenger RNA, indem es sich an die 60S Untereinheit von Ribosomen des 80S-Typs (Eukaryonten) bindet (VAZQUEZ and MONRO 1968).
Cycloheximid blockiert die Proteinsynthese ausschließlich an den cytoplasmatischen Ribosomen von Eukaryonten, die mitochondriale sowie die Proteinsynthese von Prokaryonten wird durch dieses Antibiotikum nicht beeinflußt (BEATTIE et al. 1967; LOEB and HUBBY 1968; ASHWELL and WORK 1968; LAMB et al. 1968; SEBALD et al. 1968; WINSTON and BOSSMANN 1971) .

4. Material und Methoden

4.1. Benutzte Substanzen

Aminosäuren und TMPD: Fluka AG, Buchs S.G. Schweiz

^{14}C-Phenylalanin spez. Aktivität 492 µCi/mmole : Radiochemical Centre Amersham, England

ATP, GTP, Glutathion (reduziert), Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase: Boehringer Mannheim GmbH

Cytochrom c, Typ III: Sigma, St. Louis, U.S.A.

TES, Dextransulfat, Puromycin: Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Cycloheximid: The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, U.S.A.

Chloramphenicol: Parke-Davis & Company, München

Triton X-100, Saccharose, Trichloressigsäure: E. Merck AG, Darmstadt

Lubrol WX: ICI Chemicals

Toluol (chemisch rein): Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover

PPO, POPOP: Packard Instruments GmbH, Frankfurt/Main

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad "pro analysi" bzw. "reinst".

4.2. Präparationsmedien

1. Homogenisiermedium: (Homogenat I + 3 bis I + II)

Saccharose	0,32	M
TES	2	mM
pH = 7,4		

2. Mg^{++}-Saccharose zur Isolierung von "rohen" Mikrosomen- und Zellkernfraktionen:

Saccharose	0,32	M
$MgCl_2$	3	mM
TES	2	mM
pH = 7,4		

3. Saccharose-Lösung zur Isolierung "reiner" Zellkernfraktionen:

Saccharose	2,4 M
$MgCl_2$	1 mM
TES	2 mM
pH = 7,4	

4. Saccharose-Lösung zur Isolierung von Mitochondrienfraktionen:

Saccharose	0,25 M
TES	2 mM
pH = 7,4	

5. Standardpuffer zur Gewinnung von Gehirn-Hyaloplasma (Homogenat 1+2) und als Suspensionsmedium für Mikrosomen (1 Sediment + 5 ml):

$Mg(CH_3COO)_2$	5 mM
KCl	60 mM
TES	2 mM
pH = 7,4	

6. Ca^{++}-Saccharose als Suspensionsmedium für Zellkerne (1 Kernsediment + 2 ml):

Saccharose	0,25 M
$CaCl_2$	3 mM
pH = 7,4	

4.3. Versuchstiere

Zu unseren Versuchen benutzten wir Lebergewebe von weiblichen Albino-Ratten der Stämme Wistar SW 72 (Winkelmann, Paderborn) sowie Sprague Dawley (Institut für Versuchstierkunde, F.U. Berlin) in den Gewichtsklassen von 180 - 200g.
Die Tiere bekamen Leitungswasser sowie als Futter Altromin ad libitum. Die Stalltemperatur betrug 22°C, die Luftfeuchtigkeit 50-60%.
Um von jahreszeitlich bedingten Schwankungen des Tag-Nacht-Rhythmusses unabhängig zu sein, wurden die Tiere unter einem definierten Hell/Dunkel Rhythmus gehalten (14 Stunden hell, 10 Stunden dunkel). Zu unseren Versuchen wurde Lebergewebe nur von solchen Tieren benutzt, die mindestens 14 Tage diesem Hell-Dunkel Rhythmus ausgesetzt waren.

4.4. Technik der Homogenatgewinnung und Isolierung der einzelnen Zellfraktionen mit Hilfe der Differentialzentrifugation

Die Isolierung der "rohen" Zellfraktion erfolgte im wesentlichen in Anlehnung an die Methode von HOGEBOOM und SCHNEIDER (1951).

4.4.1. Gewinnung des Leber-Homogenates

Nach Dekapitation wurde das Lebergewebe bei +4°C herauspräpariert und pro Gewichtsteil mit 7 Volumenteilen Saccharose in einem Glas-Teflon-Potter-Elvejhem Homogenisator (180 ml Fassungsvermögen, Fa. Braun, Melsungen) bei 1250 rpm und 10 Hüben homogenisiert.

4.4.2. Gewinnung des postnuclearen Überstandes

Zur Abtrennung des überwiegenden Anteils der Zellkerne und nicht aufgebrochener Zellen wurde das Homogenat in einer MSE Mistral 4 L Zentrifuge 2 x 10 Minuten bei 1500 rpm (600 x g) zentrifugiert, das resultierende Sediment verworfen.

4.4.3 Isolierung der Leber-Mikrosomen (= 80S Ribosomen + Membranmaterial des endoplasmatischen Retikulums)

Leber-Homogenat (in Mg^{++}-Saccharose) zentrifugierten wir 10 Minuten in einer MSE 18 High-Speed-Zentrifuge bei 12000 rpm (17500 x g). Der resultierende Überstand wurde 70 Minuten lang in einer Spinco L50 mit Rotor Typ 50 Ti bei 49000 rpm (155000 x g av) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand über dem Mikrosomen-Sediment abgesaugt und anschließend der Rand des Polyallomerröhrchens vorsichtig mit einem Gazestreifen ausgewischt.
Für den Fall, daß die Mikrosomen nicht umgehend zur Proteinsynthese eingesetzt wurden, wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren; direkt vor Versuchsbeginn wurde das Sediment aufgetaut, mit 2 ml Standardpuffer aufgenommen und mit einem zu den Abmessungen des Zentrifugenröhrchen passenden Plexiglaspistill bei 1250 rpm resuspendiert. Diese Mikrosomensuspension wurde mit weiteren 3 ml Standardpuffer verdünnt und anschließend mit der Biuret-Methode der Proteingehalt bestimmt. Unsere zur in vitro Pro-

teinsynthese eingesetzten Mikrosomensuspensionen wurden routinemäßig auf einen Proteingehalt von 18 mg/ml eingestellt (Verdünnung mit Standardpuffer).

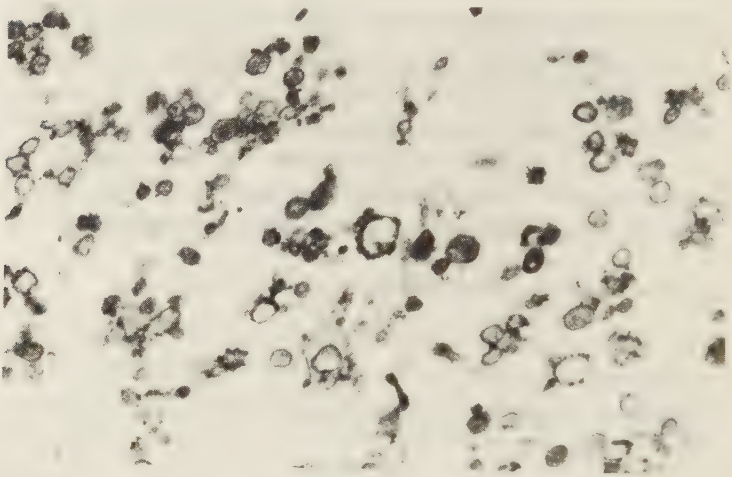


Abb. 2a: Mikrosomen, Leber, 45 500-fache Vergrößerung

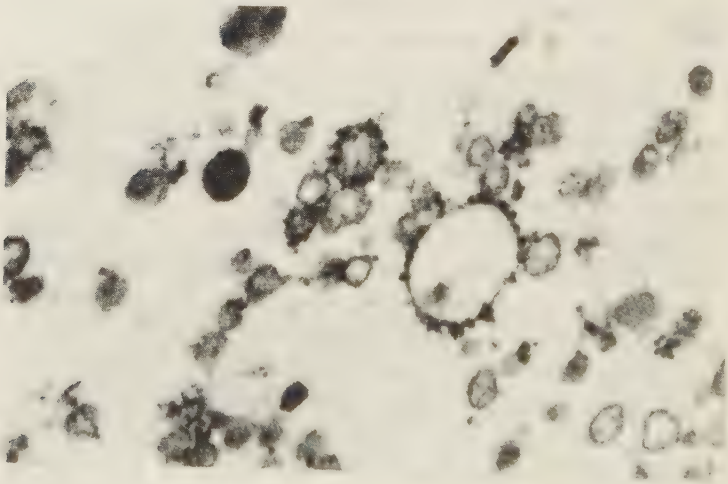


Abb. 2b: Mikrosomen, Leber, 88 000-fache Vergrößerung

4.4.4. Isolierung der Zellkernfraktion

Leber-Homogenat (in Mg^{++}-Saccharose) wurde durch 4 Lagen feinster Gaze hindurchgegeben, um größere Fettpartikel, Gewebestücke und Bindegewebe abzufiltern. Anschließend wurde das Homogenat 10 Minuten bei 1500 rpm (600 x g) in einer MSE Mistral 4L Zentrifuge zentrifugiert, ehe das Sediment 3 mal mit Magnesium-haltiger Saccharose bei 600 x g für jeweils 10 Minuten "gewaschen" wurde. Wir erhielten die "rohe" Kernfraktion, die ihrer Menge entsprechend in 2,4 M Saccharose aufgenommen wurde, so daß eine 2,2 molare Saccharose-Konzentration resultierte. Nach einer Zentrifugation von 60 Minuten bei 27500 rpm (50000 x g av) im Rotor 40 einer Spinco Ultrazentrifuge L50 wurde der Überstand abgesaugt.
Zur in vitro Proteinsynthese wurde das Zellkernsediment in 2 ml Ca^{++}-Saccharose resuspendiert.

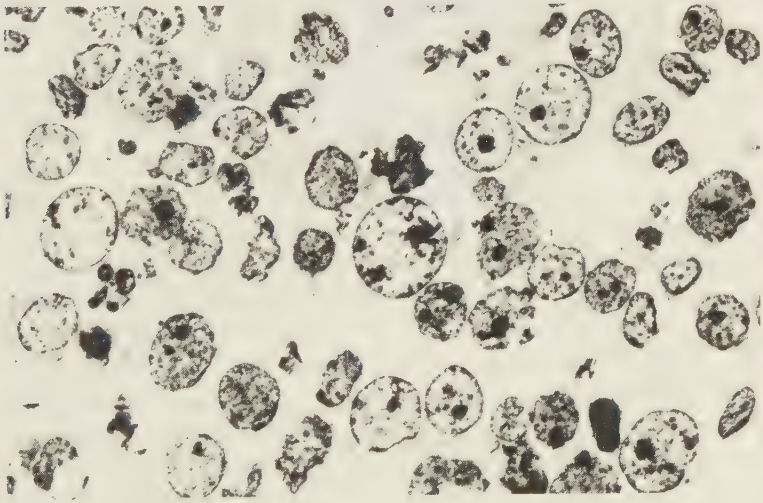


Abb. 3a: Zellkerne, Leber, 2 450-fache Vergrößerung

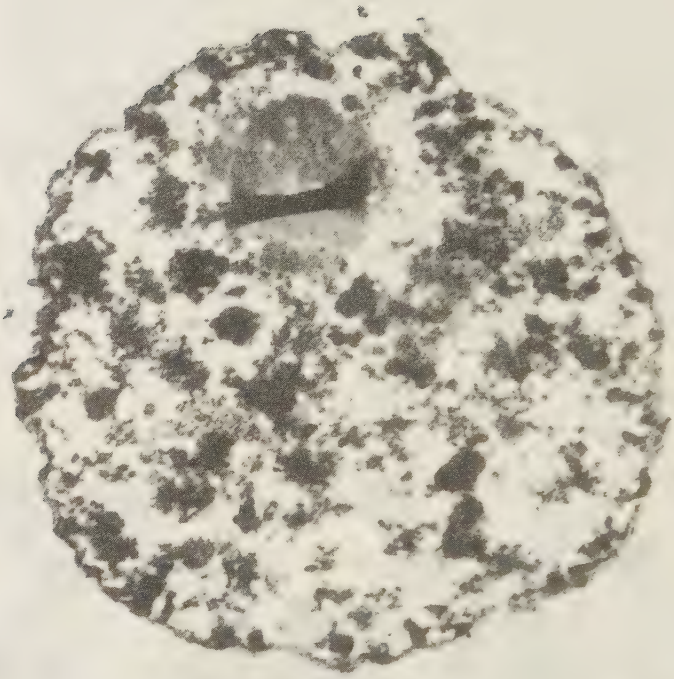


Abb. 3b: Zellkern, Leber, 25 500-fache Vergrößerung

4.4.5. Isolierung der Mitochondrienfraktion

Postnuclearer Überstand (in 0,25 M Saccharose) wurde 10 Minuten bei 12000 rpm (17500 x g) in einer MSE 18 High-Speed-Zentrifuge zentrifugiert und das resultierende Sediment in 0,25 M Saccharose aufgenommen. Es schlossen sich jeweils zehnminütige Zentrifugationen bei 11000 rpm (15000 x g), 10000 rpm (12000 x g), 9000 rpm (10000 x g), 8000 rpm (8000 x g) und 7000 rpm (6000 x g) in der MSE 18 High-Speed-Zentrifuge an.
Das resultierende Mitochondrien-Sediment wurde in 0,25 M Saccharose aufgenommen und nach der Biuret-Methode der Protein-Gehalt bestimmt. Unsere zur in vitro Proteinsynthese eingesetzten Mitochondriensuspensionen wurden auf einen Proteingehalt von 15 mg/ml eingestellt.

Als Kontrolle für den Reinheitsgrad der einzelnen Zellfraktionen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen im II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin, Abteilung "Embryonalpharmakologie" bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Merker angefertigt. Für seine Unterstützung danke ich an dieser Stelle herzlich.
Alle Proben wurden folgendermaßen für die Elektronenmikroskopie vorbereitet:
Fixation in Karnowsky-Lösung (3% frisch destillierter Glutaraldehyd, 3% Paraformaldehyd, 0,1 M Cacodylatpuffer, pH = 7,2); nach der Abzentrifugation der Probe wurde das Sediment mit 0,1 M Cacodylatpuffer, pH = 7,2 gewaschen und danach in einer Lösung von 0,1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH = 7,2 aufgenommen. Dann Entwässerung der einzelnen Proben in Aceton und Einbettung in Micropal (Fa. Ferak, Berlin). Die Schnitte wurden mit einem Reichert oder LKB-Microtom hergestellt, zur Kontrastierung wurden Uranylacetat und Bleiacetat verwendet. Die Aufnahmen wurden in einem Siemens Elmiskop I und Ia bei 2000- bis 20000-facher Vergrößerung mit bis zu 3 1/2-facher photographischer Nachvergrößerung gemacht.

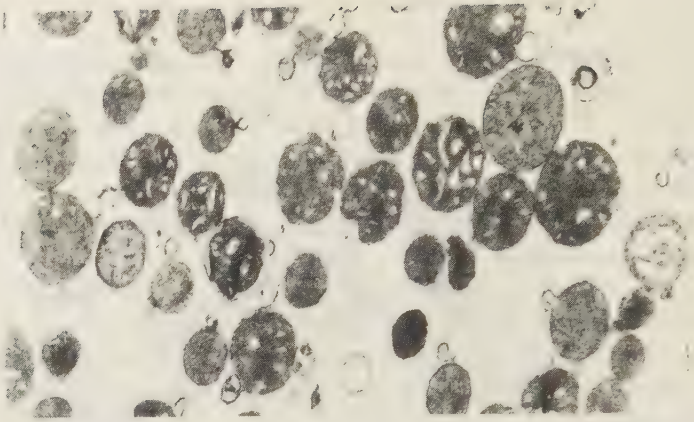


Abb. 4a: Mitochondrien, Leber, 24 000-fache Vergrößerung

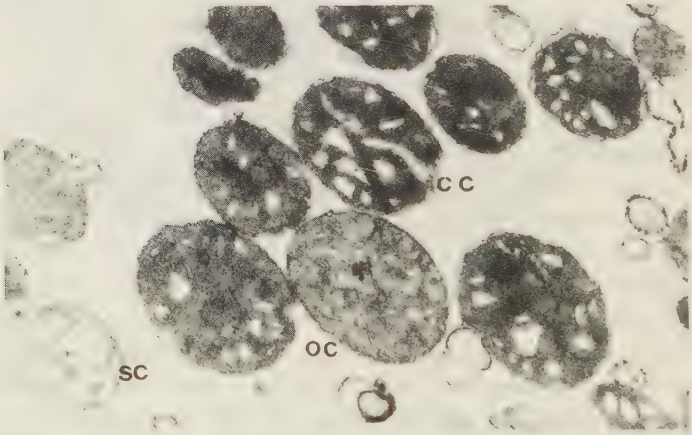
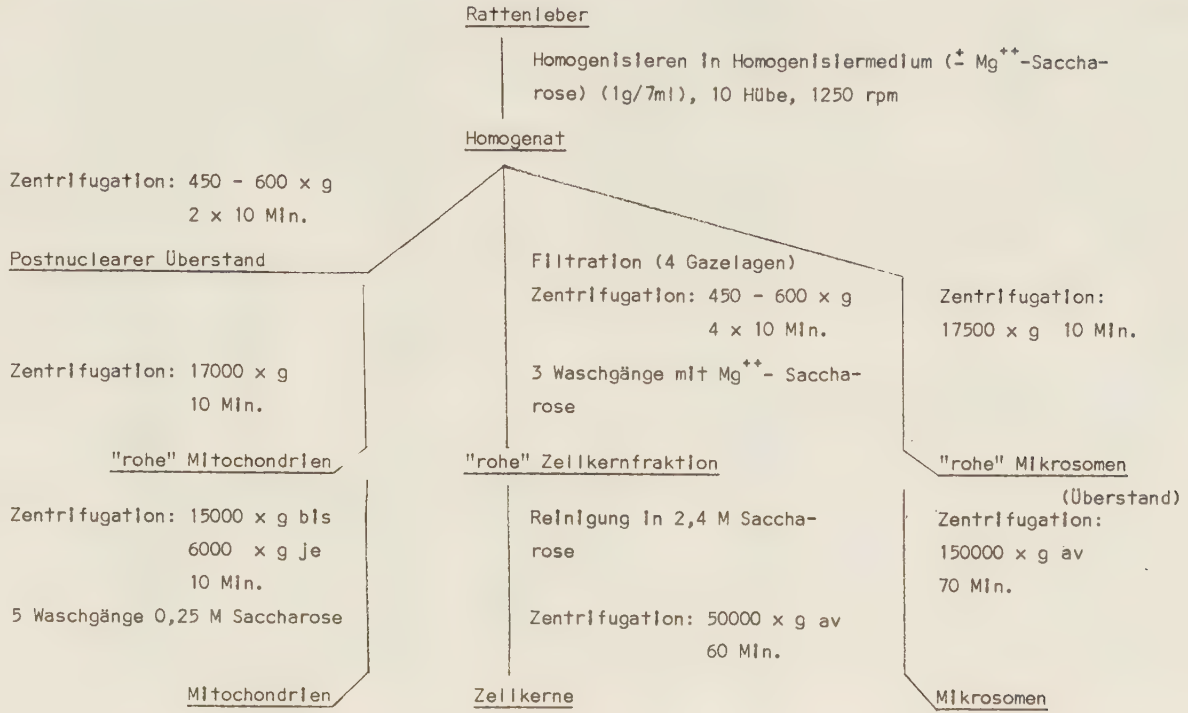


Abb. 4b: Mitochondrien, Leber, 33 000-fache Vergrößerung
OC = orthodox conformation
CC = condensed conformation
SC = swollen conformation
Die Bezeichnung der Mitochondrienkonfiguration erfolgte nach Hackenbrock 1966.

Tabelle 1: Schema der Homogenatgewinnung und der Zellfraktionierung (bei +4°C)



4.4.6. Hyaloplasma

Gehirn oder Leber wurde pro Gewichtsteil mit zwei Volumenteilen Standardpuffer oder 0,25 M Saccharose in einem Glas-Teflon-Potter-Elvejhem-Homogenisator (180 ml Fassungsvermögen) bei 1250 rpm und 10 Hüben homogenisiert. Das Homogenat wurde in der MSE 18 High-Speed-Zentrifuge 12 Minuten bei 12000 rpm (17500 x g), der resultierende Überstand 70 Minuten bei 49000 rpm (155000 x g av) in der Spinco L50 Rotor-Typ 50 Ti zentrifugiert. Die klare Hyaloplasma-Fraktion wurde vom Sediment abpipettiert.

4.4.7. Gewinnung einer pH 5 - Enzymfraktion aus Gehirnhyaloplasma (modifiziert nach KELLER and ZAMECNIK 1956)

Gehirn-Hyaloplasma wurde mit 1 N Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt, anschließend die Fraktion 7 1/2 Minuten in der MSE 18 High-Speed-Zentrifuge bei 12000 rpm (17500 x g) zentrifugiert. Das resultierende Sediment haben wir in Standardpuffer pH 5,2 aufgenommen und nochmals 7 1/2 Minuten bei 7000 rpm (6000 x g) zentrifugiert. Abschließend wurde das Sediment in Standardpuffer resuspendiert und die pH 5-Enzymfraktion auf pH 7,4 eingestellt zur in vitro Proteinsynthese verwendet.
Alle Vorgänge wurden bei +4°C durchgeführt.

4.5. Ansätze zur Messung der Proteinsynthese

Der routinemäßig angesetzte Inkubationsansatz enthielt - wenn nicht anders angegeben - folgende Volumina:

1) Aminosäuregemisch	0,05 ml
2) ^{14}C-L-Phenylalanin	0,05 ml
3) "Medium"	0,10 ml
4) Tris-HCl pH 7,8 oder Puromycin, Chloramphenicol, Cyclohexlmid (gelöst in 0,1 M Tris-HCl pH 7,8)	0,10 ml
5) Gehirnhyaloplasma oder Standardpuffer	0,10 ml
6) Homogenat oder Zellfraktion	0,10 ml
Ansatzvolumen	0,50 ml

1) Aminosäuregemisch

Im Aminosäuregemisch sind 20 Aminosäuren in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8 gelöst, und zwar

L-Alanin	L-Isoleucin
L-Argenin	L-Leucin
L-Asparaginsäure	L-Lysin
L-Asparagin	L-Methionin
L-Cystin	L-Prolin
Glycin	L-Serin
L-Glutamin	L-Threonin
L-Glutaminsäure	L-Tryptophan
L-Histidin	L-Tyrosin
L-Hydroxyprolin	L-Valin

Die Konzentration jeder Aminosäure beträgt: 0,05 µmole/0,05 ml Aminosäuregemisch.
Endkonzentration im Ansatz je Aminosäure = 0,1 mM.

2) ^{14}C-L-Phenylalanin-Lösung

Spezifische Aktivität des ^{14}C-L-Phenylalanin war: 492 µCi/µmol (^{14}C-Phe), die Menge betrug 5 µCi/ml (in 2% Äthanollösung).

3) "Medium"

bestehend aus		Endkonzentration im Ansatz
Adenosintriphosphat	(ATP)	0,5 mM
Guanosintriphosphat	(GTP)	1,0 mM
Glutathion, reduziert	(GSH)	1,5 mM
Phosphoenolpyruvat	(PEP)	5,0 mM
Pyruvatkinase		20 g/ml Ansatz
Magnesiumchlorid	($MgCl_2$)	11 mM
Kaliumchlorid	(KCl)	62 mM
Tris-HCl, pH 7,8		50 mM

In Abänderung von dem oben beschriebenen "Medium" benutzten wir für die Versuche mit isolierten Zellfraktionen sowie mit Homogenat (Versuch 5.3.1.) ein modifiziertes "Medium"; es enthielt:

		Endkonzentration im Ansatz
Adenosintriphosphat	(ATP)	1,0 mM
Guanosintriphosphat	(GTP)	1,0 mM
Glutathion, reduziert	(GSH)	1,5 mM
Phosphoenolpyruvat	(PEP)	5,0 mM
Pyruvatkinase		20 µg/ml Ansatz
Magnesiumchlorid	($MgCl_2$)	10 mM
Kaliumchlorid	(KCl)	100 mM
Phosphat-Puffer (Sörensen)	KH_2PO_4	66 mM
pH 7,6	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	66 mM

Tris-HCl wurde im Inkubationsansatz routinemäßig durch TES Puffer (10 mM) pH 7,6 ersetzt.

Für den Versuch beschrieben unter 5.2.1.3. benutzten wir vergleichsweise das Inkubationssystem nach Neupert. Es enthielt abweichend von dem oben beschriebenen Medium:

		Endkonzentration im Ansatz
Adenosintriphosphat	(ATP)	4,0 mM
Phosphoenolpyruvat	(PEP)	2,5 mM
Äthylendiamintetra-essigsäure	(EDTA)	2,0 mM

sowie kein Hyaloplasma.

4.6. Durchführung der Inkubation und Waschvorgang

Wir bestimmten den Einbau von ^{14}C-L-Phenylalanin in Protein, modifiziert nach MANS and NOVELLI (1960).

a) Inkubation (37°C)

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Homogenates bzw. der jeweiligen Zellfraktion gestartet und der Inkubationsansatz sofort gut durchgemischt. Zur Bestimmung des 0-Wertes wurden unmittelbar anschließend 0,1 ml aus dem Inkubationsansatz entnommen und auf ein

mit "Wasch-TCA"[1] vorbehandeltes trockenes Filterpapierplättchen[2] pipettiert. Der Ansatz wurde zur Inkubation sofort in ein 37°C-Wasserbad gestellt, das Filterpapierplättchen ca. 15 Sekunden geföhnt und in eiskalte "Wasch-TCA" gegeben (5 ml TCA pro Plättchen).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein Aliquot von 0,1 ml aus dem Ansatz entnommen, auf ein vorbehandeltes Plättchen gebracht und dem oben beschriebenen Vorgang unterzogen.

b) Waschvorgang

Die "Wasch-TCA" wurde innerhalb 80 Minuten 7 mal erneuert; die Säure stoppt die enzymatische Reaktion und bewirkt die Präzipitation des synthetisierten Proteins an die Matrix des Cellulose-Filterpapierplättchens. Nun wurden die Plättchen 20 Minuten bei 90°C in 5%ige "Wasch-TCA" gebracht, um RNA und aminosäuregebundene s-RNA zu hydrolysieren und zu extrahieren. Jeweils 15 Minuten befanden sich die Plättchen anschließend in einem Gemisch von Äther und absolutem unvergälltem Alkohol (Mischungsverhältnis 1:1) sowie in reinem Äther, um Trichloressigsäure, Lipide und das Wasser zu entfernen. Anschließend wurden die Plättchen ca. 10 Minuten zum Trocknen auf Filterpapier aufgelegt.

4.7. Inkubation von Mitochondrien oder Hyaloplasma bei 37°C vor Zugabe der radioaktiv markierten Aminosäure

Die jeweilige Fraktion wurde bei 37°C im Inkubationsansatz, der kein ^{14}C-Phenylalanin enthielt, vorinkubiert. Nach Ablauf der gewählten Vorinkubationszeit wurde das radioaktiv markierte Phenylalanin hinzupipettiert (Start des ^{14}C-Phe-Einbaues in Protein), und falls nicht anders angegeben, weitere 15 Minuten inkubiert (siehe Abb. 5). Anschließend wurden 0,1 ml entnommen, auf ein Fil-

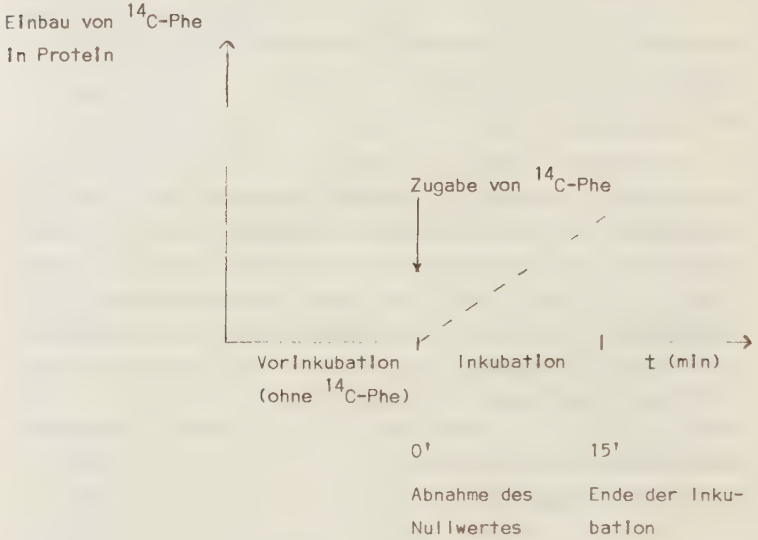
---

1) "Wasch-Trichloressigsäure" ("Wasch-TCA")
0,05 molar inaktives L-Phenylalanin in 10% Trichloressigsäure (Gewicht/Volumen)

2) Vorbehandelte Plättchen
Plättchen aus Whatman-Filterpapier Nr. 3 kreisrund, 2,5 cm Durchmesser. Das Plättchen wurde ca. 15 Minuten in "Wasch-TCA" getränkt und anschließend zwischen Filterpapier getrocknet.

terplättchen gebracht und wie üblich weiterbehandelt (siehe 4.6.).

Abb. 5: Versuchsschema



4.8. Messung der Radioaktivität und Bestimmung der Zählausbeute

Die Radioaktivität wurde im Packard TRI CARB Liquid Scintillation-Spectrometer, Modell 3380, gemessen. Als Zählgemisch für die Plättchen wurde Toluol p.a., das pro Liter 4,0 g PPO 2,5-Diphenyloxazol und 0,05 g Dimethyl-POPOP 1,4- bis -2- (4-Methyl-5 Phenyloxazolyl)-Benzol enthielt, verwandt. Jedes einzelne Plättchen wurde in 8 ml Zählgemisch gezählt.

Zur Bestimmung der Zählausbeute wurde eine bestimmte Menge ^{14}C-Phenylalanin (5500 dpm) auf ein Filterpapierplättchen pipettiert, in Zählgemisch gebracht und im Packard TRI CARB Liquid Scintillation-Spectrometer die Radioaktivität gemessen. Dabei ergab sich eine Zählausbeute von 3709 cpm $\hat{=}$ 67,4%.

4.9. Quantitative Proteinbestimmung

a) Kjeldahl-Verfahren

Der Proteingehalt der Leber-Homogenate sowie von Zellkernfraktionen wurde durch die N-Bestimmung der Proben nach Kjeldahl mittels einer Destillationsapperatur (Fa. W. Büchi, Flawil, Schweiz) ermittelt.

b) Biuret-Reaktion

Reagentien:

0,19 % Lubrol oder 10 % Triton
10 % NaOH
2 % $CuSO_4$

Der Proteingehalt in Leber-Mitochondrien wurde wie folgt bestimmt:

Zu 0,1 ml Mitochondriensuspension wurden 0,9 ml Wasser gegeben. Von dieser Verdünnung wurden 0,1 ml mit 0,9 ml Lubrol und 0,6 ml 10 % NaOH versetzt und gut durchgeschüttelt. Danach wurden 0,075 ml einer 2 % $CuSO_4$-Lösung hinzugegeben, ehe nach 5 Minuten Wartezeit die Extinktion dieses Ansatzes bei 546 nm an einem Eppendorf-Photometer gegen den entsprechenden Leerwert gemessen wurde.
Gleichermaßen wurde mit einem Ansatz zur Messung der Eigentrübung verfahren, der jedoch anstelle der 2 % $CuSO_4$-Lösung die gleiche Menge Wasser enthielt. Der in diesem Ansatz gemessene Extinktionswert wurde von dem "Meß"-Wert abgezogen.
Aus einer ebenso hergestellten Eichkurve mit Serum-Albumin (BSA) wurde der Proteingehalt abgelesen und auf ml Mitochondriensuspension umgerechnet.
Der Proteingehalt in Mikrosomen wurde auf ähnliche Weise bestimmt. Als Detergens wurde anstelle von 0,19 % Lubrol 10 % Triton (in H_2O) benutzt.

4.10. RNA-Bestimmung

Zur quantitativen RNA und DNA Bestimmung werden die Fraktionen (Homogenat, Mikrosomen, Zellkerne) einer Säure-Laugen-Extraktion unterworfen. Die Methodik kann in 2 Teile gegliedert werden:

a) Waschvorgang

Die zu untersuchende Fraktion wurde mit 5 ml einer natrium-pyrophosphathaltigen 2 % $HClO_4$ versetzt (27 ml 70 %ige (Gewicht/Volumen) $HClO_4$, 25 g $Na_4P_2O_7 \cdot 10\ H_2O$ pro 1,0 l). Um kleine Mengen Protein quantitativ auszufällen, wurde bei Bedarf BSA hinzugegeben. Nachdem diese Lösung 10 bis 15 Minuten in Eis gestanden hatte, wurde der Niederschlag in einer Christ Laborzentrifuge bei 0°C und 5000 rpm abzentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde anschließend noch 3 mal mit jeweils 5 ml der 2 % $HClO_4$ gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abgegossen.

b) Extraktionsvorgang

Das gut abgetropfte Sediment wurde in 3 ml einer 0,3 N NaOH aufgenommen und in ein Schüttelbad bei 37°C gestellt. Nach Ablauf einer Stunde wurden die Proben herausgenommen und in einem Eisbad abgekühlt; zu der Probe gaben wir 1 ml einer 20 % $HClO_4$ hinzu und liessen sie für 15 Minuten stehen. Nach erneuter Zentrifugation wurde aus dem resultierenden Überstand die RNA bestimmt.
Sie wurde als Ribose mit der Orcin-Methode (OGUR und ROSEN 1950) bestimmt und durch Messung der Extinktion bei 668 nm errechnet (0,4 % Orcin, 0,04 % $FeCl_3$, 37 %ige HCl).
Reaktionsansatz: 1 ml Testlösung und 2 ml Reagenz.
Eichsubstanz: Hefe-Ribonucleinsäure (0 - 50 µg/Ansatz).

4.11. DNA-Bestimmung

Zur Bestimmung der DNA wird die Zellkernfraktion dem gleichen Waschvorgang unterworfen, wie er unter "RNA-Bestimmung" beschrieben worden ist. Zur DNA-Extraktion wird das abgetropfte Sediment mit 2 ml einer 5 % $HClO_4$ versetzt und für 15 Minuten in ein Schüttelbad bei 75°C gestellt. Anschließend wird die Probe abermals zentrifugiert

und ein Aliquot des Überstandes für die DNA-Bestimmung (nach BURTON 1956) eingesetzt.

Reagenz:

3 % Diphenylamin, 0,01 % Acetaldehyd, 2,75 ml 95-98 %ige (Gewicht/Gewicht) Schwefelsäure und Eisessig ad 100,0 ml.

Reaktionsansatz:

1 ml Testlösung und 2 ml Reagenz.
Als Vergleichssubstanz wurde Kalbsthymus-DNA verwendet (25 und 50 µg). Die Intensität der Farbe, die sich nach 20 Stunden bei Zimmertemperatur entwickelte, wurde durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 625, 595 und 565 nm nach der Formel $2 \cdot E_{595} - (E_{565} + E_{625})$ bestimmt (NEUBERT, OBERDISSE und BASS 1968).

4.12. Cytochromoxydase-Bestimmung

Die Aktivität der Cytochromoxydase wurde polarographisch in einer 2 ml Kammer mit der Clark' Sauerstoffelektrode nach der Methode von SCHNAITMAN et al. (1967) bestimmt. In die Kammer wurden nacheinander einpipettiert:
1,39 ml einer 0,1 M KH_2PO_4 Lösung pH = 7,4, 0,1 ml einer 11,6 mM Na-Ascorbatlösung, 0,06 ml einer 0,2 mM TMPD-Lösung und 100 µl Mitochondriensuspension, die zuvor 15 Minuten mit dem Detergens Lubrol inkubiert worden war. Die Kammer wurde dann mit Wasser aufgefüllt, verschlossen und mittels Magnetrührer gerührt. Durch Zugabe von 0,1 ml einer 0,05 mM Cytochrom c Lösung (Endkonzentration) wurde die Reaktion gestartet. Die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches als Funktion der Aktivität der Cytochromoxydase wurde nach der Formel

$$\frac{\% O_2 \cdot 5{,}2 \text{ nmole } O_2 \cdot F}{\text{min} \cdot \text{Volumen Ferment} \cdot \mu\text{l}}$$

berechnet.
F = Verdünnungsfaktor der Mitochondriensuspension; bei 25°C enthält 1 ml wässrige Lösung 260 µmole Sauerstoff (ESTABROOK, R.W. 1967).

5. Ergebnisse und Diskussion

Der von uns in den folgenden Versuchen verwendete postnucleare Überstand enthält Zellkerne nur als geringfügige Verunreinigung, da die Hauptmenge der Zellkernfraktion vorher herauszentrifugiert wurde. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da es zur Zeit keinen selektiv auf die Kernproteinsynthese wirkenden Hemmstoff gibt. Durch Cycloheximid werden sowohl die ribosomale Proteinsynthese als auch die Kernproteinsynthese gehemmt, während Chloramphenicol ausschließlich die mitochondriale Proteinsynthese beeinflußt.

5.1. Versuche mit postnuclearem Überstand

5.1.1. Abhängigkeit der Proteinsynthese-Aktivität von der eingesetzten Menge Gewebe

Wir testeten die Abhängigkeit des ^{14}C-Phenylalaineinbaues in Protein von der zugesetzten Menge Lebergewebe aus. Dazu wurde jeweils 1 Gewichtsteil Lebergewebe mit 1, 3, 5, 7, 11 und 15 Volumenteilen Saccharose homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellkerne wurden jeweils 0,05 ml, 0,1 ml, 0,15 ml und 0,2 ml der verschiedenen Verdünnungen zur Proteinsynthese eingesetzt. Die unverdünnte Suspension hatte einen Proteingehalt von 104,25 mg/ml.
Eine lineare Beziehung zwischen ^{14}C-Phenylalaineinbau und eingesetzter Menge postnuclearen Überstandes wurde bei einer Verdünnung von 1 g Lebergewebe mit 7 oder mehr ml Homogenisiermedium (Saccharose) gemessen. Um einen möglichst hohen absoluten ^{14}C-Phe-Einbau zu erhalten, wurde die Konzentration von 1 g + 7 ml für alle folgenden Versuche mit postnuclearem Überstand gewählt.

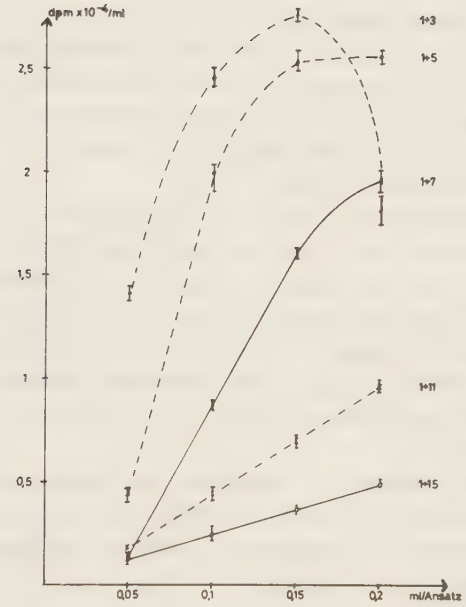


Abb. 6: Abhängigkeit der Proteinsynthese-Aktivität von der eingesetzten Menge des postnuclearen Überstandes

Verdünnungen 1 + 3 (Gewicht/Volumen), 1 + 5, 1 + 7, 1 + 11 und 1 + 15. Gewinnung der Suspensionen und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Inkubationszeit: 10 Minuten
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5.1.2. Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese mit postnuclearem Überstand

Um in unserem System etwas über die Einbauraten der zur Proteinsynthese befähigten Ribosomen und Mitochondrien des postnuclearen Überstandes in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aussagen zu können, sind die ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen worden. Zur Kontrolle der Linearität wurden 0,1 ml und 0,2 ml der Suspension eingesetzt, die einen Proteingehalt von 40 mg/ml hatte.
Ein linearer Anstieg der ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten kann bei postnuclearem Überstand bis zu 5 Minuten Inkubationszeit gemessen werden; in der Folgezeit verringern sich die Steigungen beider Kurven. Da in diese Zeitkurven die Einzelkinetiken von Ribosomen und Mitochondrien eingehen, sind der steile lineare Anstieg vorwiegend als Ribosomen-Kinetik, der abknickende Endverlauf als Mitochondrien-Kinetik anzusehen (vgl. Seite 32 Abb, 10 und Seite 34 Abb. 11).
Innerhalb des Zeitraumes von 20 Minuten resultierte eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Menge eingesetzten Fermentes und den gemessenen ^{14}C-Phe-Einbauraten (direkt proportionale Fermentabhängigkeit).

5.1.3. Einfluß von Puromycin, Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit postnuclearem Überstand

Zur Messung von ribosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität aus postnuclearem Überstand sollten die selektiv wirkenden Hemmstoffe Cycloheximid und Chloramphenicol benutzt werden. Um zu ermitteln, welche Hemmstoffkonzentrationen notwendig sind, ist der Ansatz mit verschiedenen Konzentrationen Cycloheximid und Chloramphenicol versetzt worden. Die Hemmung der ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten durch Puromycin sollte beweisen, daß der im postnuclearen Überstand gemessene Einbau eine Proteinsynthesereaktion ist.
60 µg Puromycin/ml Ansatz bewirken eine nahezu vollständige Hemmung der Proteinsynthese von 0,2 ml postnuclearem Überstand (Abb.8).

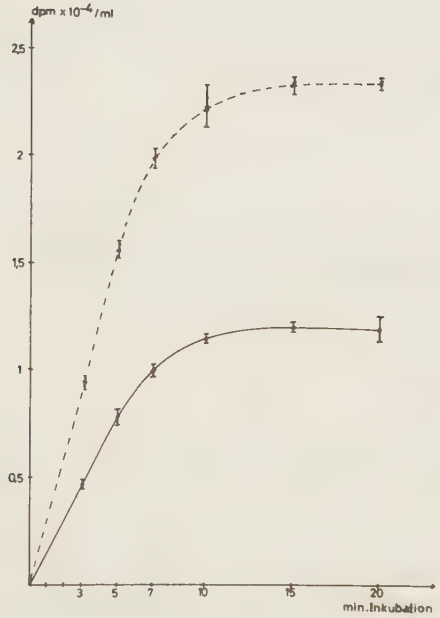


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese mit postnuclearem Überstand

0,1 ml (•————•) und 0,2 ml (X-----X) Suspension
Gewinnung des postnuclearen Überstandes und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

Während bei "reinen" Mitochondrien und unseren Inkubationsbedingungen 30 - 100 µg Chloramphenicol pro ml Ansatz ausreichen, um die mitochondriale Proteinsynthese zu hemmen (Abb. 17), wird bei Verwendung des postnuclearen Überstandes die Hemmung durch Chloramphenicol erst ab 180 µg/ml Ansatz deutlich und nimmt bei höheren Hemmstoff-Konzentrationen nicht weiter zu. Für den im postnuclearen Überstand überwiegenden Anteil der Ribosomen sind zwischen 60 µg und 180 µg Cycloheximid pro ml Ansatz notwendig, um eine maximale Hemmung zu erzielen.

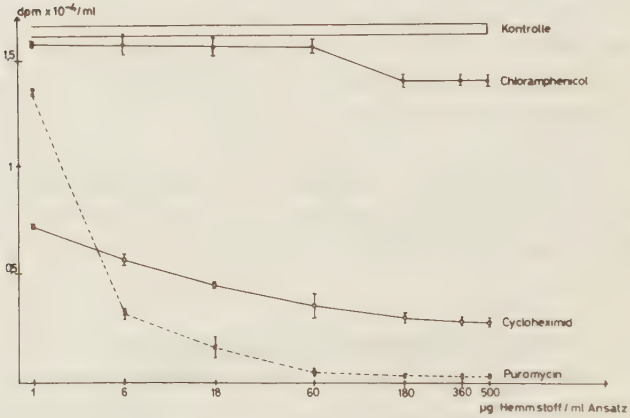


Abb. 8: Einfluß von Puromycin, Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit postnuclearem Überstand

Puromycin (x------x); Chloramphenicol (• ———— •); Cycloheximid (o———o)

Gewinnung des postnuclearen Überstandes (38 mg Protein/ml) und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" angegeben.

Inkubationszeit : 6 Min.

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5.2. Versuche mit Mikrosomen, Mitochondrien und Zellkernen aus Leber-Homogenaten

Um im postnuclearen Überstand die mikrosomale und mitochondriale Proteinsynthese-Aktivität zu messen, sollten im Inkubationssystem - wie in der Zelle - für beide Zellfraktionen optimale Aminsäure-Einbaubedingungen gewährleistet sein. Die Messung der Proteinsyntheseraten erfolgte bisher in einem Inkubationssystem, welches von WIEDEMANN 1972 zur Messung der mikrosomalen Proteinsynthese ausgetestet worden war, und somit für die Mikrosomenfraktion optimale Einbaubedingungen bieten sollte. Für isolierte Mitochondrienfraktionen ist von NEUPERT ein spezifisches Inkubationssystem zur Proteinsynthese in vitro entwickelt worden. JÄGER verglich in noch unveröffentlichten Versuchen die ^{14}C-Phenylalanin-Einbaubedingungen von postnuclearem Überstand in beiden Inkubationssystemen und stellte keinen Unterschied in der Höhe der jeweils resultierenden Proteinsyntheseraten fest. Da jedes dieser Systeme optimale Einbaubedingungen für jeweils nur eine Zellfraktion- Mikrosomen oder Mitochondrien - bieten sollte, lassen die bisherigen Versuchsergebnisse keine endgültige Aussage über die Anwendbarkeit eines dieser Medien zur Differenzierung mikrosomaler von mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität in "Homogenaten" zu.
Wir haben deshalb im Folgenden versucht, optimale Aminosäure-Einbaubedinungen für Mikrosomen und Mitochondrien auszutesten. Dazu führten wir im Weiteren unsere Experimente mit isolierten Zellfraktionen in einem veränderten Inkubationsmedium durch (siehe "Material und Methoden", Abschnitt 4.5.); es sollte außerdem geprüft werden, ob sich unter diesen veränderten Versuchsbedingungen aus Mikrosomen und Mitochondrien ein "Homogenat" mit jeweils einem Cycloheximid- und Chloramphenicol-empfindlichen Anteil zusammensetzen läßt.
Die zur in vitro-Proteinsynthese eingesetzten Zell-Organell-Suspensionen hatten, sofern nicht anders angegeben, im linearen Bereich folgende Aktivität:

Mikrosomen: 9,6 ± 1 pmole ^{14}C-Phenylalanin eingebaut pro mg RNA x min.

Mitochondrien: 0,07 ± 0,01 pmole ^{14}C-Phenylalanin eingebaut pro Unit Cytox. x min. (1 U Cytox = 1 µmol O_2/min)

Zellkerne: 0,49 ± 0,03 pmole ^{14}C-Phenylalanin eingebaut pro mg DNA x min.

5.2.1. Zeit- und Fermentabhängigkeit der Proteinsynthese mit Zellkernen, Mikrosomen und Mitochondrien

Um etwas über den Aminosäureeinbau in Protein mit Zellkernen, Mikrosomen und Mitochondrien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aussagen zu können, wurden die ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten zu verschiedenen Inkubationszeiten bestimmt. Zur Kontrolle der Fermentabhängigkeit setzten wir jeweils 0,1 ml und 0,2 ml derselben Organellensuspension in das Inkubationssystem ein.

5.2.1.1. Zellkerne

Neben der "Klassischen" Proteinsynthese an m-RNA und Ribosomen im Cytoplasma wird eine ähnlich ablaufende Reaktion auch in Zellkernen vermutet (LOGAN et al. 1959; ALLFREY et al. 1964; UETE 1967).
Bis zu etwa 10 Minuten Inkubation erhielten wir einen linearen Einbau von ^{14}C-Phenylalanin, ehe die Kurven abknickten. Im Zeitraum 10 - 120 Minuten Inkubation erfolgt pro Zeiteinheit ein geringerer Aminosäureeinbau, möglicherweise als Ausdruck einer messenger RNA-Verarmung im Reaktionsansatz, der nach 120 Minuten noch nicht beendet ist.
Eine proportionale Fermentabhängigkeit konnte nur bis zu etwa 20 Minuten Inkubation gemessen werden; die mangelnde Spezifität des Inkubationssystems zur Messung der Kernproteinsynthese wurde hingenommen, da es vorwiegend zur Differenzierung von mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese aus von diesen Zellpartikeln zusammengesetztem "Homogenat" verwendet werden sollte.

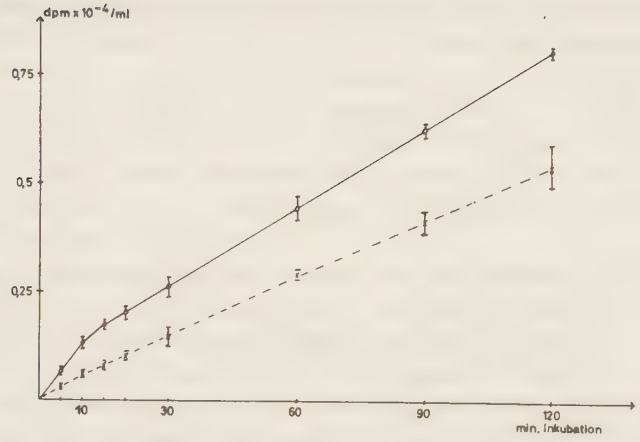


Abb. 9: Zeit- und Fermentabhängigkeit der Proteinsynthese mit Zellkernen

0,1 ml (x------x) und 0,2 ml (o———o) Kernsuspension.
Gewinnung der Zellkerne und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" angegeben.
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5.2.1.2. Mikrosomen

Auch bei diesem Versuch wurden die Proteinsyntheseraten zwei verschieden konzentrierter Mikrosomensuspensionen miteinander verglichen. (Abb. 10)
Bei beiden Kurven zeigt sich bis zu einer Inkubationszeit von 5 Minuten eine lineare Beziehung der ^{14}C-Phenylalanin-Einbaurate; im weiteren Verlauf nimmt die Steigung beider Kurven fortlaufend ab (Erschöpfung des endogenen "messengers"). Nach 90 Minuten ist der Aminosäureeinbau in Protein nahezu beendet, der endogene "messenger" verbraucht.

Abbildung 10 zeigt weiterhin, daß bei Einsatz der doppelten Menge Mikrosomensuspension ein ungefähr doppelt so hoher Einbau von ^{14}C-Phenylalanin in Protein resultierte (proportionale Fermentabhängigkeit).

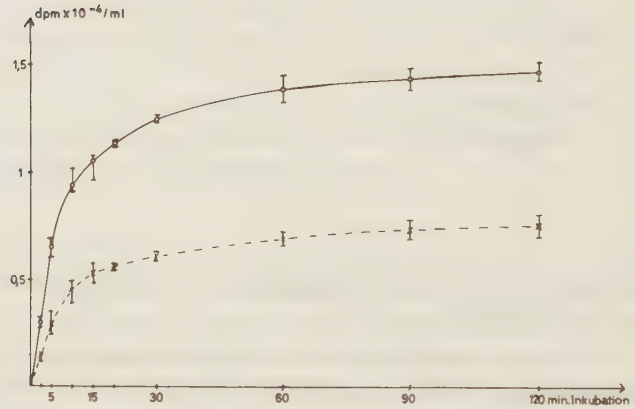


Abb. 10: Zeit- und Fermentabhängigkeit der Proteinsynthese mit Mikrosomen

0,1 ml Mikrosomensuspension (x------x); 0,2 ml Mikrosomensuspension (o------o).
Gewinnung der Mikrosomen und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" angegeben.
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5.2.1.3. Mitochondrien

Abbildung 11 zeigt 3 Einbaukurven für Mitochondrien. Die beiden unteren Kurven (Symbole o———o und x------x) geben die Einbauraten für 0,2 ml und 0,1 ml Mitochondriensuspension wieder. Bis zu etwa 5 - 10 Minuten Inkubation ist ein linearer ^{14}C-Phenylalaineinbau in Protein zu verzeichnen. Dies ist insofern bemerkenswert, als in der Literatur linearer Aminosäureeinbau in Mitochondrienprotein bis zu etwa 30 Minuten Inkubation beschrieben worden ist (NEUPERT 1972; ROODYN et al. 1961).

Dieses Untersuchungsergebnis ist vermutlich auf mangelnde Spezifität unseres in vitro-Systems für Mitochondrien zurückzuführen, welchem abweichend von dem durch Neupert verwendeten Hyaloplasma zugesetzt ist; Hyaloplasma enthält die Aminosäuren aktivierenden Enzyme (HOAGLAND et al. 1956), die t-RNAs und die Enzyme, die den Transport der Aminoacyl-transfer-RNA an die Ribosomen katalysieren, sowie die löslichen Faktoren der Proteinsynthese und nicht definierte Komponenten.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die mikrosomale Proteinsynthese in vitro auf zugesetzte lösliche Faktoren des Hyaloplasmas angewiesen ist, während Mitochondrien durch Zugabe dieser Faktoren nicht stimuliert werden (ZAMECNICK und KELLER 1954; BRAUN et al. 1963); sie verfügen wahrscheinlich über ausreichende Konzentrationen oben beschriebener Faktoren sowie eigene t-RNA. Da jedoch die Proteinsynthese des aus Mikrosomen und Mitochondrien zusammengesetzten "künstlichen Homogenates" gemessen werden sollte, war es nicht möglich, das für Mitochondrien geeignetere System (ø Hyaloplasma) zu verwenden.

Eine lineare Fermentabhängigkeit konnten wir nur bis zu etwa 5 Minuten Inkubation beobachten; dies wurde ebenfalls auf die in vitro-Bedingungen zurückgeführt.

Vergleichsweise sind in Abbildung 11 auch die ^{14}C-Phe-Einbauraten aufgetragen worden, die in Abwesenheit von Hyaloplasma gemessen wurden (Symbol •—•—•—•—•); diese Kurve bestätigt linearen Aminosäureeinbau bis zu 30 Minuten Inkubation.

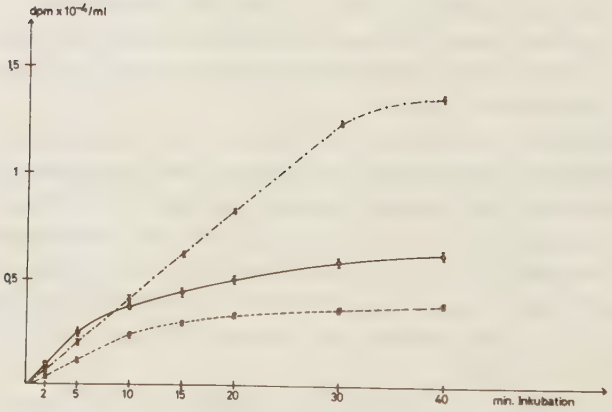


Abb. 11: Zeit- und Fermentabhängigkeit der Proteinsynthese mit Mitochondrien; Vergleich zweier Inkubationssysteme

0,1 ml (x------x) und 0,2 ml (o———o; •—•—•—•—•) Mitochondriensuspension.
Gewinnung der Mitochondrien und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" angegeben. (x------x) und (o———o) mit Hyaloplasma, (•—•—•—•—•) ohne Hyaloplasma im Ansatz.
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

Aus Mikrosomen, Mitochondrien und Hyaloplasma sollte in vitro ein "Homogenat" zusammengesetzt werden, aus dem mit Hilfe der selektiven Hemmstoffe Chloramphenicol und Cycloheximid die mikrosomale bzw. mitochondriale Proteinsynthese-Aktivität differenziert werden sollte; dazu müßten sich bei unseren Versuchsbedingungen die ge-

trennt gemessenen ^{14}C-Phe-Einbauraten dieser Zellpartikel nach Inkubation beider Organellensuspensionen in einem gemeinsamen Ansatz zu einer "Gesamteinbaurate" addieren lassen.
Folgende Kombinationen mit gereinigten Zellfraktionen sind untersucht worden:

1. Mikrosomen + Zellkerne + Hyaloplasma
2. Mitochondrien + Zellkerne + Hyaloplasma
3. Mitochondrien + Mikrosomen + Hyaloplasma

5.2.2. Inkubation von Zellkernen und Mikrosomen in einem Versuchsansatz

SCHNEIDER 1959 und 1960, ISHIKAWA et al. 1969 und 1971 sowie RASKAS 1971 haben zeigen können, daß es in vitro einen messenger-RNA Transport aus dem Zellkern in das Cytoplasma gibt. Sollte dieser RNA Transport auch bei unseren Versuchsbedingungen möglich sein, wäre denkbar, daß durch diese von den Zellkernen "ausgeschleuste" RNA zusätzlich messenger-Eigenschaften verfügbar würden; möglicherweise könnte dann bei Kombination von Zellkernen und Mikrosomen die mikrosomale Proteinsynthese-Aktivität nach Erschöpfung des eigenen endogenen "messengers" nochmals stimuliert werden. Sollte dies zutreffen, sollten sich die ^{14}C-Phe-Einbauraten dieser Zellpartikel im gemeinsamen Inkubationsansatz nicht nur addieren, sondern es müßte eine höhere Summe resultieren, als rechnerisch zu erwarten wäre.

5.2.2.1. Freisetzung von RNA aus isolierten Zellkernen

0,3 ml Kernsuspension wurden in Medium (siehe Material und Methoden S. 18) und TES-Puffer unter Zusatz des RNAse-Hemmstoffes Dextransulfat (50 µg/ml Ansatz) 20 Minuten bei 37^{o}C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Inkubat 5 Minuten bei 5000 rpm in einer Christ Laborzentrifuge zentrifugiert. Aus dem resultierenden Überstand, dem Sediment sowie der Zellkernsuspension wurde die RNA bestimmt.
50,5 % der in der Zellkernsuspension bestimmten RNA ließen sich nach

Inkubation und Zentrifugation der Zellkerne im resultierenden Überstand nachweisen, 34,4 % der RNA fanden sich noch im Kernsediment (Tabelle 2). Vermutlich sind trotz Zusatz von Dextransulfat ca. 15 % der Gesamt-RNA während des Inkubations- und Zentrifugationsvorganges durch RNAsen Aktivität verlorengegangen.

	µg RNA/ml	%
Zellkernsuspension	86,6	100
Überstand	43,8	50,5
Kernsediment	29,8	34,4
Rückgewinnung		84,9

Tabelle 2

RNA-Bestimmung aus Zellkernen sowie aus Überstand und Kernsediment nach Inkubation und Zentrifugation.

Alle Werte stellen Mittelwerte von 4-fach-Bestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

5.2.2.2. Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Zellkerne, Mikrosomen sowie Zellkerne + Mikrosomen

Zellkerne und Mikrosomen wurden in wechselnden Mengen einzeln und gemeinsam in einem Inkubationsansatz zur in vitro-Proteinsynthese eingesetzt und die jeweiligen ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen.

Aus den Proteinanteilen von Zellkernen und Mikrosomen am Gesamtgehalt des Zellproteins läßt sich errechnen, daß ein Verhältnis von einem Teil Kernprotein zu 1,33 Teilen Mikrosomenprotein im in vitro-Ansatz den in vivo Bedingungen entsprechen würde (Tabelle 3).

Gesamtzellprotein	Kerne	Mikrosomen	Mitochondrien
100 %	15 %	20 %	25 %
Relation	1 : 1,33	1 : 1,25	

Tabelle 3

Proteinrelationen in Zellpartikeln

Nun besteht jedoch die Schwierigkeit, die Proteinmenge in Zellkernen vor der in vitro-Inkubation möglichst schnell zu ermitteln. Der Zeitfaktor ist deshalb von Bedeutung, weil die gemessenen Einbauraten bei Aufbewahrung der Kernsuspension über einen Zeitraum von mehr als 15 Minuten, der für eine Proteinbestimmung benötigt würde, bereits deutlich absinken. Darum wurde die Messung der Proteinmenge erst nach dem Versuch durchgeführt. Die Kern-zu Mikrosomen-Relationen im in vitro-Ansatz mußten also so gewählt werden, daß auf jeden Fall einmal ein Kernüberschuß und einmal ein Mikrosomenüberschuß resultierte. Die im Folgenden beschriebenen Versuche ergaben nachstehende Kern/Mikrosomen Verhältnisse (Protein):

Abb. 12: 1 : 5,74, also ein Überschuß am Mikrosomenanteil

Tab. 3b: 1 : 0,56, also ein Überschuß am Kernanteil

Der in Tabelle 3a erreichte Quotient von 1 : 1,9 kommt den in vivo-Bedingungen noch am nächsten.

Abbildung 12 gibt die Einbaukurven für 0,05 ml Zellkernsuspension, 0,15 ml Mikrosomen sowie des entsprechenden Kern-Mikrosomengemisches wieder. Die Kern- und auch die Mikrosomenkinetik zeigen den unter 5.2.1.1. und 5.2.1.2. beschriebenen typischen Verlauf. Der Einbau von ^{14}C-Phenylalanin in Protein des Zellkern-Mikrosomengemisches ist über 120 Minuten Inkubation die Summe der getrennt gemessenen Einbauraten dieser Zellpartikel.

Obwohl ein RNA Transport aus isolierten Zellkernen in unser Inkubationssystem nachgewiesen werden konnte, hat diese "ausgeschleuste" RNA die mikrosomale Proteinsynthese-Aktivität über das erwartete Maß hinaus nicht verlängern können.

In Tabelle 3 a/b sind die nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessenen ^{14}C-Phe-Einbauraten für folgende Zellkern- bzw. Mikrosomensuspensionsmengen wiedergegeben:

a) 0,1 ml Kerne
   0,1 ml Mikrosomen
   0,1 ml Kerne + 0,1 ml Mikrosomen

b) 0,15 ml Kerne
   0,05 ml Mikrosomen
   0,15 ml Kerne + 0,05 ml Mikrosomen

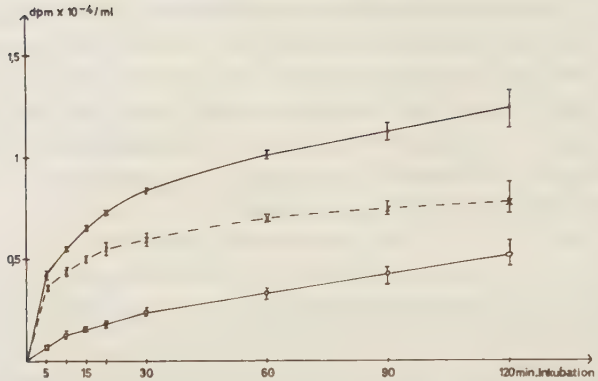


Abb. 12: Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Zellkerne, Mikrosomen sowie Zellkerne + Mikrosomen

0,05 ml Kernsuspension (o———o); 0,15 ml Mikrosomensuspension (x-----x); 0,05 ml Kerne + 0,15 ml Mikrosomen (•———•).
0,05 ml Kerne ≙ 1 Ke = 0,47 mg Protein
0,05 ml Mikrosomen ≙ 1 Ms = 0,9 mg Protein
Herstellung der Zellkern- bzw. Mikrosomensuspension und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

Es ist jeweils der errechnete Additionswert (Summe der ^{14}C-Phe-Einbauraten der jeweiligen Kern- bzw. Mikrosomensuspension) mit dem im Kombinationsansatz (Kerne + Mikrosomen) gemessenen verglichen worden. Die einzeln gemessenen Einbauraten von 0,1 ml Kernsuspension und 0,1 ml Mikrosomensuspension bzw. 0,15 ml Kernen und 0,05 ml Mikrosomen ergaben nach Addition die jeweils im gemeinsamen Inkubationsansatz gemessenen Werte.

3a)

Menge Organellen-suspension	Protein/Ansatz (mg/ml) und Proteinrelation	^{14}C-Phe-Einbau (dpm/ml) nach			
		15 min	30 min	60 min	120 min
2 Ke	0,94	1400	2250	3280	5250
2 Ms	1,80 1:1,9	3150	3960	4800	5900
2 Ke + 2 Ms (errechneter Wert)		4550	6210	8080	11150
2 Ke + 2 Ms (gemessener Wert)		4320	6180	7890	11550

3b)

Menge Organellen-suspension	Protein/Ansatz (mg/ml) und Proteinrelation	^{14}C-Phe-Einbau (dpm/ml) nach			
		15 min	30 min	60 min	120 min
3 Ke	1,61	2370	3420	4410	6470
1 Ms	0,90 1:0,56	3330	3840	4680	6150
3 Ke + 1 Ms (errechneter Wert)		5700	7260	9090	12620
3 Ke + 1 Ms (gemessener Wert)		5940	7470	9360	12600

Tabelle 3 a/b

^{14}C-Phenylalaninein bau in Protein: Zellkerne, Mikrosomen sowie Zellkerne + Mikrosomen

0,05 ml Kernsuspension $\hat{=}$ 1 Ke = 0,47 mg Protein

0,05 ml Mikrosomensuspension $\hat{=}$ 1 Ms = 0,9 mg Protein

Inkubationszeiten: 15 min., 30 min., 60 min., 120 min.

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben. Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

5.2.3. Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Mitochondrien, Zellkerne sowie Zellkerne + Mitochondrien

Um die Proteinsynthese-Aktivität von Zellkernen, Mitochondrien sowie Zellkernen + Mitochondrien miteinander vergleichen zu können, wurden diese Zellfraktionen einzeln und zusammen in einem Inkubationsansatz zur in vitro-Proteinsynthese eingesetzt und die ^{14}C-Phe-Einbauraten nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen.
Die Relation von Zellkernprotein zu Mitochondrienprotein beträgt in der Zelle etwa 1:1,66, wie aus Tabelle 3 berechnet werden kann. Die im Folgenden beschriebenen Versuche ergaben nachstehende Kern/Mitochondrien Verhältnisse (Protein):
Abb. 13: 1 : 0,77 (Überschuß an Kernprotein)
Tab. 4a: 1 : 6,90 (Überschuß an Mitochondrienprotein)
Der in Tabelle 4b erreichte Quotient von 1 : 2,3 kommt den in vivo-Bedingungen am nächsten.
Abbildung 13 gibt die Einbaukurven für 0,05 ml Mitochondrien, 0,15 ml Kerne sowie des entsprechenden Kern-Mitochondriengemisches wieder. Die Kinetiken dieser Zellpartikel sind mit den unter 5.2.1.1. und 5.2.1.3. beschriebenen vergleichbar; die ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten des Kern-Mitochondriengemisches sind bis zu 120 Minuten Inkubation Summe der entsprechenden Einzeleinbauraten für Zellkerne bzw. Mitochondrien.

In Tabelle 4 a/b sind die nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessenen ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten für folgende Zellkern- bzw. Mitochondriensuspensionsmengen wiedergegeben:

a) 0,1 ml Kerne
   0,1 ml Mitochondrien
   0,1 ml Kerne + 0,1 ml Mitochondrien

b) 0,05 ml Kerne
   0,15 ml Mitochondrien
   0,05 ml Kerne + 0,15 ml Mitochondrien

Es ist jeweils der errechnete Additionswert (Summe der ^{14}C-Phe-Einbauraten der jeweiligen Kern- bzw. Mitochondriensuspension) mit dem im Kombinationsansatz (Kerne + Mitochondrien) gemessenen ver-

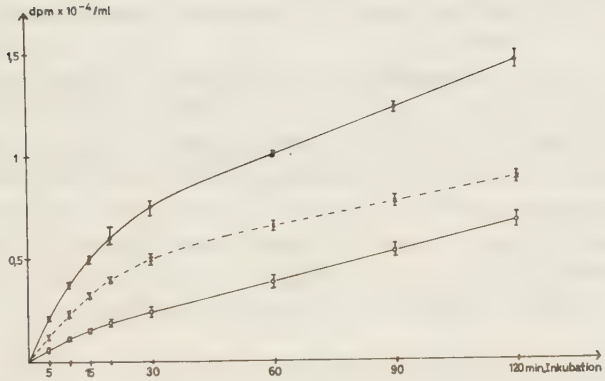


Abb. 13: Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Mitochondrien, Zellkerne sowie Zellkerne + Mitochondrien

0,05 ml Mitochondriensuspension (x-----x);
0,15 ml Kernsuspension (o———o); 0,05 ml Mitochondrien + 0,15 ml Kerne (•———•).
0,05 ml Mitochondrien ≙ 1 Mch = 0,75 mg Protein
0,05 ml Kerne ≙ 1 Ke = 0,325 mg Protein
Herstellung der Zellkern- bzw. Mitochondriensuspension und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

glichen worden. Während die im Kombinationsansatz aus 0,05 ml Kernsuspension und 0,15 ml Mitochondriensuspension gemessenen Einbauraten bis zu 120 Minuten Inkubation mit den errechneten Additionswerten gut übereinstimmen, ergaben die einzeln gemessenen Einbauraten von 0,1 ml Kernsuspension und 0,1 ml Mitochondriensuspension lediglich bis zu 30 Minuten Inkubation nach Addition die im gemeinsamen Inkubationsansatz ge-

messenen Werte; nach 60 Minuten differierte der gemessene vom errechneten Additionswert um 14 %, nach 120 Minuten um ca. 20 %.

4a)

Menge Organellensuspension	Protein/Ansatz (mg/ml) und Proteinrelation	^{14}C-Phe-Einbau (dpm/ml) nach			
		15 min	30 min	60 min	120 min
1 Ke	0,325	750	1370	2220	4090
3 Mch	2,25 1:6,9	6830	8910	10730	13170
1 Ke + 3 Mch (errechneter Wert)		7580	10280	12950	17260
1 Ke + 3 Mch (gemessener Wert)		7680	10260	13150	16950

4b)

Menge Organellensuspension	Protein/Ansatz (mg/ml) und Proteinrelation	^{14}C-Phe-Einbau (dpm/ml) nach			
		15 min	30 min	60 min	120 min
2 Ke	0,65	980	1590	2820	5590
2 Mch	1,5 1:2,3	5170	6790	8440	10840
2 Ke + 2 Mch (errechneter Wert)		6150	8380	11260	16430
2 Ke + 3 Mch (gemessener Wert)		6090	8040	9660	12990

Tabelle 4 a/b

^{14}C-Phenylalaineinbau in Protein: Zellkerne, Mitochondrien sowie Zellkerne + Mitochondrien

0,05 ml Mitochondrien $\hat{=}$ 1 Mch = 0,75 mg Protein

0,05 ml Kerne $\hat{=}$ 1 Ke = 0,325 mg Protein

Inkubationszeiten: 15 min., 30 min., 60 min. und 120 min..

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

5.2.4. Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Mikrosomen, Mitochondrien sowie Mikrosomen + Mitochondrien

Mitochondrien und Mikrosomen wurden zur in vitro-Proteinsynthese eingesetzt und gleichermaßen verfahren, wie in Kapitel 5.2.2.2. bzw. 5.2.3. beschrieben.
Aus Abbildung 14 sowie Tabelle 5 a/b geht hervor, daß durch gemeinsame Inkubation von Mikrosomen und Mitochondrien ein "Homogenat" zu erhalten ist, dessen Proteinsynthese-Aktivität - meßbar durch Zählung des ^{14}C-Phenylalaineinbaues in Protein - sich aus den Einbauraten von Mikrosomen und Mitochondrien zusammensetzt.
Mit Hilfe der differenzierenden Hemmstoffe Chloramphenicol und Cycloheximid kann dann aus diesem "Homogenat" die mikrosomale bzw. mitochondriale Proteinsynthese-Aktivität getrennt abgelesen werden.

In Tabelle 5 a/b sind die nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessenen ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten für folgende Mikrosomen - bzw. Mitochondriensuspensionsmengen wiedergegeben:

a) 0,1 ml Mikrosomen
   0,1 ml Mitochondrien
   0,1 ml Mikrosomen + 0,1 ml Mitochondrien

b) 0,15 ml Mikrosomen
   0,05 ml Mitochondrien
   0,15 ml Mikrosomen + 0,05 ml Mitochondrien

Es ist jeweils der errechnete Additionswert (Summe der ^{14}C-Phe-Einbauraten der jeweiligen Mikrosomen- bzw. Mitochondriensuspension) mit dem im Kombinationsansatz (Mikrosomen + Mitochondrien) gemessenen verglichen worden. Auch hier ist bei der Kombination b) der gemessene Wert nur bis zu 60 Minuten Inkubation die wahre Summe der beiden Komponenten.

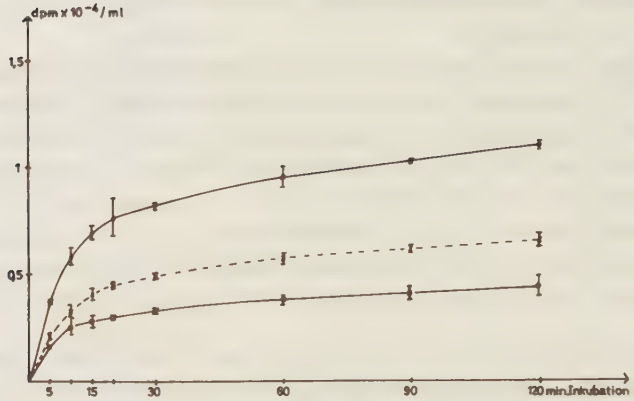


Abb. 14: Zeitabhängigkeit der Proteinsynthese: Mikrosomen, Mitochondrien sowie Mikrosomen + Mitochondrien

0,05 ml Mikrosomensuspension (o———o);

0,15 ml Mitochondriensuspension (x------x); 0,05 ml Mikrosomen + 0,15 ml Mitochondrien (•———•).

0,05 ml Mikrosomen ≙ 1 Ms = 0,9 mg Protein

0,05 ml Mitochondrien ≙ 1 Mch = 0,75 mg Protein

Das Verhältnis von Mikrosomenprotein zu Mitochondrienprotein betrug 1:2,5.

Herstellung der Mikrosomen- bzw. Mitochondriensuspension und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5a)

Menge Organellen-suspension	Protein/Ansatz (mg/ml) und Proteinrelation	^{14}C-Phe-Einbau (dpm/ml) nach 15 min	30 min	60 min	120 min
2 Ms	1,8	5690	6350	6930	8170
2 Mch	1,5 1:0,83	3020	3380	4100	4680
2 Ms + 2 Mch (errechneter Wert)		8710	9730	11030	12850
2 Ms + 2 Mch (gemessener Wert)		9300	9930	11350	11940

5b)

Menge Organellen-suspension	Protein/Ansatz (mg/ml) und Proteinrelation	^{14}C-Phe-Einbau (dpm/ml) nach 15 min	30 min	60 min	120 min
3 Ms	2,7	8850	9750	10800	12790
1 Mch	0,75 1:0,28	1830	2500	2610	3310
3 Ms + 1 Mch (errechneter Wert)		10680	12250	13410	16100
3 Ms + 1 Mch (gemessener Wert)		9990	12210	12870	13350

Tabelle 5 a/b

^{14}C-Phenylalaninein bau in Protein: Mikrosomen, Mitochondrien sowie Mikrosomen + Mitochondrien

0,05 ml Mikrosomen $\hat{=}$ 1 Ms = 0,9 mg Protein

0,05 ml Mitochondrien $\hat{=}$ 1 Mch = 0,75 mg Protein

Inkubationszeiten: 15 min., 30 min., 60 min. und 120 min..

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

5.2.5. Hemmung der Proteinsynthesen von isolierten Zellkernen, Mikrosomen und Mitochondrien durch Puromycin

Um zu beweisen, daß mit isolierten Zellpartikeln bei unseren Versuchsbedingungen eine Polypeptidsynthese in vitro abgelaufen ist, ist die Proteinsynthese-Aktivität von Zellkernen, Mikrosomen und Mitochondrien durch Puromycin gehemmt worden. Der Wirkungsmechanismus des Puromycins wurde bereits im theoretischen Teil beschrieben (Seite 5).
Mit 100 µg Puromycin/ml Ansatz konnten die Proteinsynthese-Aktivitäten von Zellkernen, Mikrosomen und Mitochondrien im Durchschnitt zu 95 % gehemmt werden (Tabelle 6).

	^{14}C-Phe-Einbau (dpm/ml)	% Hemmung
Zellkerne	3860	0
+ Puromycin	200	95
Mikrosomen	10430	0
+ Puromycin	590	94,5
Mitochondrien	9240	0
+ Puromycin	570	94

Tabelle 6
Einfluß von Puromycin auf die Proteinsynthese-Aktivität von Zellkernen, Mikrosomen und Mitochondrien
Herstellung der Organellensuspensionen und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Hemmstoffkonzentration: 100 µg Puromycin/ml Ansatz
Inkubationszeit: 15 Minuten
Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

5.2.6. Einfluß verschiedener Mengen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit Mikrosomen

Um aus einem aus Mikrosomen, Mitochondrien und Hyaloplasma zusammengesetzten "Homogenat" die Proteinsynthese-Aktivität dieser einzelnen Zellfraktionen zu messen, sollten die differenzierenden Hemmstoffe Cycloheximid und Chloramphenicol verwendet werden. Cycloheximid hemmt die ribosomale Proteinsynthese bei Eukaryonten infolge Bindung an die 60S Untereinheit von 80S Ribosomen, Chloramphenicol hingegen hat keinen hemmenden Effekt. Die mitochondriale Proteinsynthese wird selektiv von CAP gehemmt, während Cycloheximid hier unwirksam ist (siehe 3.2.2. und 3.2.3.).
Ziel dieses Versuches war es einerseits, die Cycloheximidmenge pro Inkubationsansatz zu ermitteln, mit der die mikrosomale Proteinsynthese vollständig gehemmt werden kann; bei dieser Hemmstoffkonzentration darf die Proteinsynthese in Mitochondrien natürlich nicht beeinflußt werden. Andererseits sollte die Unempfindlichkeit der Proteinsynthese an Mikrosomen gegen Chloramphenicol gezeigt werden; hierzu wurden gleichermaßen verschiedene Hemmstoffmengen den Inkubationsansätzen zugesetzt und das Versuchsergebnis graphisch aufgetragen (Abbildung 15).
Mit der Cycloheximidmenge von 200 µg pro ml Ansatz kann die mikrosomale Proteinsynthese nahezu vollständig gehemmt werden; eine Verdoppelung der Hemmstoffmenge im Inkubationsansatz erbringt kein besseres Resultat. Nach Zusatz von 200 µg Chloramphenicol wird eine angedeutete Verminderung der mikrosomalen Proteinsynthese-Aktivität sichtbar; mit 400 µg Hemmstoff konnte eine 15 %ige Hemmung gemessen werden. Eine grobe Verunreinigung der Mikrosomenfraktion durch Mitochondrien, die letztere Hemmrate erklären würde, haben wir elektronenmikroskopisch ausschließen können (siehe Abb. 2a und 2b); deshalb ist bei dieser hohen Chloramphenicolkonzentration ein toxischer Effekt auf Mikrosomen wahrscheinlich.

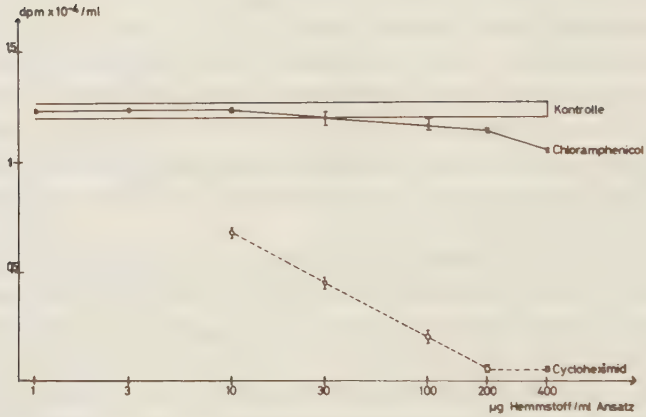


Abb. 15: Einfluß verschiedener Mengen von CAP und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit Mikrosomen

Chloramphenicol (•———•); Cycloheximid (o------o).

Herstellung der Mikrosomenfraktion und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.

Inkubationszeit: 15 Minuten

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5.2.7. Einfluß verschiedener Mengen von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit Zellkernen

In Zellkernen wird eine ähnliche wie im Cytoplasma an 80S Ribosomen ablaufende Proteinsynthese vermutet (LOGAN et al. 1959; ALLFREY et al. 1964; UETE 1967). Da gezeigt werden konnte, daß die mikrosomale Proteinsynthese stark Cycloheximid-empfindlich ist, und erst nach Zusatz von 400 µg CAP/ml Ansatz zu 15 % gehemmt wurde, interessierte, ob nach Beeinflussung der nuclearen Proteinsynthese mit Chloramphenicol und Cycloheximid ähnliche Ergebnisse resultierten.
Mit 200 µg Cycloheximid/ml Ansatz wird die Proteinsynthese in Zellkernen zu 95 % gehemmt; ähnliches ergab sich bei der Hemmung der mikrosomalen Proteinsynthese durch dieses Antibiotikum. Der Hemmeffekt bei der nuclearen Proteinsynthese durch Chloramphenicol setzt vergleichsweise früher als bei Mikrosomen ein; zwischen 10 µg und 30 µg Chloramphenicol pro ml Ansatz tritt eine Hemmung des Aminosäureeinbaus ein, die bis zu 15 % des gesamten Einbaus erreicht. Auch mit größeren Menegen Chloramphenicol nimmt diese Hemmung nicht weiter zu.
Diese Hemmkurve wäre typisch für eine Verunreinigung der Zellkernfraktion durch Mitochondrien. Da die Cycloheximid-Hemmbarkeit der Kernfraktion jedoch nahezu vollständig ist, läßt sich bei der Streuung der Werte nicht entscheiden, ob die CAP-Hemmbarkeit auf einer Verunreinigung durch Mitochondrien oder auf einer Empfindlichkeit der Kernproteinsynthese gegenüber Chloramphenicol beruht.

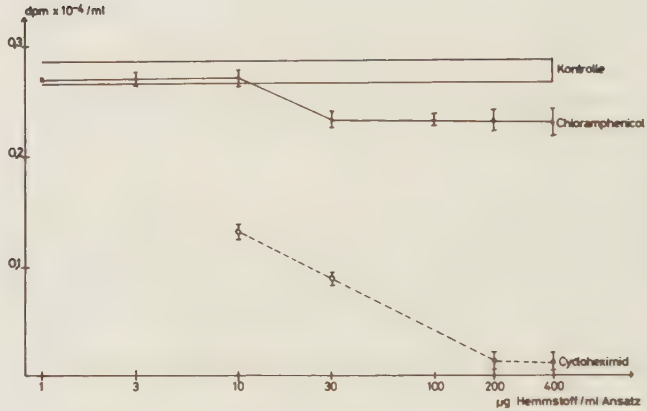


Abb. 16: Einfluß verschiedener Mengen von CAP und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit Zellkernen

Chloramphenicol (•———•); Cycloheximid (o------o).

Herstellung der Kernfraktion und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.

Inkubationszeit: 15 Minuten

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5.2.8. Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese-Aktivität durch Chloramphenicol und Cycloheximid

Ziel dieser Versuchsreihe war es einerseits, die Chloramphenicolmenge pro Inkubationsansatz zu ermitteln, mit der die mitochondriale Proteinsynthese vollständig gehemmt werden kann, die Proteinsynthese-Aktivität an Mikrosomen hingegen nicht beeinträchtigt wird. Zum anderen sollte die relative Unempfindlichkeit der Proteinsynthese in Mitochondrien gegen Cycloheximid gezeigt werden; hierzu wurden gleichermaßen verschiedene Hemmstoffmengen den Inkubationsansätzen zugesetzt und das Versuchsergebnis graphisch aufgetragen (Abbildung 17). Wie die Abbildung zeigt, ist die Chloramphenicolmenge von 100 µg pro ml Ansatz ausreichend, um die Proteinsynthese der Mitochondrienfraktion zu ca. 92 % zu hemmen; auch mit der doppelten Chloramphenicolkonzentration läßt sich keine höhere Hemmrate erzielen.
Nach Zusatz von Cycloheximid kann ebenfalls eine gewisse Hemmung der Proteinsynthese-Aktivität gemessen werden. Mit 100 µg und 200 µg resultiert eine ca. 10 %ige Hemmung.
Ein Vergleich beider Hemmkurven zeigt, daß der durch 100 µg bzw. 200 µg Cycloheximid gehemmte Anteil der mitochondrialen Proteinsynthese etwa ebenso groß ist wie der durch 100 µg CAP ungehemmte. Daraus folgt, daß mit 100 µg CAP/ml Ansatz die mitochondriale Proteinsynthese vollständig unterdrückt werden kann; mit 100 µg bzw. 200 µg Cycloheximid wird die Proteinsynthese-Aktivität gehemmt, die aus einer Verunreinigung der isolierten Mitochondrienfraktion durch Mikrosomen resultiert.

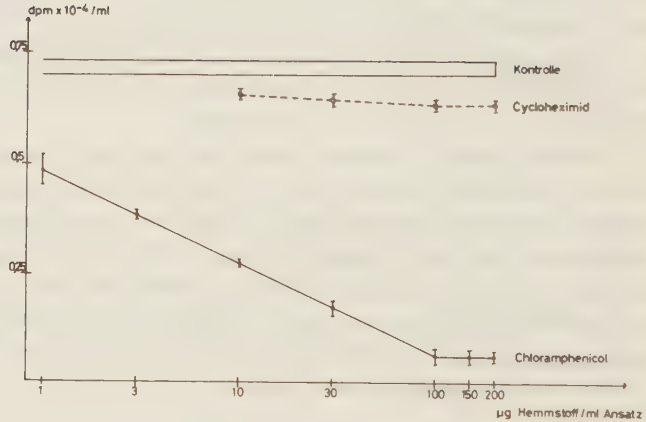


Abb. 17: Einfluß verschiedener Mengen von CAP und Cycloheximid auf die Proteinsynthese mit Mitochondrien

Chloramphenicol (•———•); Cycloheximid (o-----o).
Herstellung der Mitochondrienfraktion und Inkubationsansatz (ø Hyaloplasma) wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Inkubationszeit: 20 Minuten
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

5.2.9. Einfluß von Hyaloplasma auf die mitochondriale Proteinsynthese; Hemmung durch Chloramphenicol und Cycloheximid

Aus den vorangegangenen Versuchen zur Ermittlung optimaler Chloramphenicol- bzw. Cycloheximidkonzentrationen zur Differenzierung mitochondrialer - von mikrosomaler Proteinsynthese-Aktivität aus postnuclearem Überstand folgte:

1. durch 200 µg Cycloheximid/ml Inkubationsansatz wird die in vitro Proteinsynthese an Mikrosomen praktisch vollständig gehemmt, die mitochondriale Proteinsynthese-Aktivität hingegen nicht beeinflußt
2. durch 200 µg CAP/ml Ansatz kann die mitochondriale Proteinsynthese praktisch vollständig gehemmt werden, die Proteinsynthese an Mikrosomen bleibt jedoch unbeeinflußt.

Mit diesen Hemmstoffkonzentrationen im Inkubationsansatz sollte daher eine exakte Differenzierung der Proteinsynthese-Aktivitäten von Mikrosomen und Mitochondrien aus einem von diesen Zellpartikeln sowie Hyaloplasma zusammengesetzten "Homogenat" möglich sein.
Nun wissen wir jedoch aus vorangegangenen Versuchen, daß Mitochondrien in einem Inkubationsmedium, das die für eine mikrosomale Proteinsynthese optimale Hyaloplasmamenge enthält, ^{14}C-Phenylalanin nur bis zu etwa 10 Minuten linear einbauen und pro Zeiteinheit erheblich weniger Eiweiß synthetisieren, als in Hyaloplasma-freien Proben (siehe 5.2.1.3.). Optimale Versuchsbedingungen für die mitochondriale Proteinsynthese in vitro gewährleisten demnach nur Systeme, denen erheblich weniger Hyaloplasma zugesetzt wird (JÄGER und BASS, 1975); da jedoch Mikrosomen auf zugesetzte lösliche Faktoren des Hyaloplasmas angewiesen sind, um Eiweiß zu synthetisieren, ist die Zugabe von Hyaloplasma unerläßlich, wenn die Syntheserate in einem aus Mikrosomen und Mitochondrien zusammengesetzten "Homogenat" gemessen werden soll.
Ziel der folgenden Versuche war es, die Rolle des Hyaloplasmas auf die mitochondriale Proteinsynthese sowie deren Hemmung durch Chloramphenicol und Cycloheximid genauer zu klären. Hierzu haben wir Mitochondrien mit und ohne Hyaloplasma inkubiert; um gröbere Verun-

reinigungen der Mitochondriensuspension oder des Hyaloplasmas durch Mikrosomen auszuschließen, sind beide Fraktionen mit dem Ziel, den endogenen "messenger" dieser Mikrosomen zu verbrauchen und somit eine Proteinsynthese-Aktivität weitgehend auszuschließen, vorinkubiert worden (Methode siehe 4.7.).
Natürlich geht das während der Vorinkubationszeit synthetisierte Protein der Messung verloren; da jedoch der endogene "messenger" der verunreinigenden Mikrosomen gegenüber den Bedingungen der Vorinkubation weitaus empfindlicher als der der Mitochondrien ist, sollte nach einer solchen Vorinkubation eine hohe Chloramphenicol-Empfindlichkeit bzw. Cycloheximid-Unempfindlichkeit resultieren. Tabelle 7 zeigt das Versuchsergebnis. Im Hyaloplasma-freien Inkubationsansatz konnte die mitochondriale Proteinsynthese-Aktivität durch Chloramphenicol zu ca. 98 % gehemmt werden, der Rest war Cycloheximid-empfindlich. Im Inkubationsansatz mit Hyaloplasmazusatz resultierten trotz Verwendung gleicher Mitochondrienpräparation (gleicher Reinheitsgrad der Organellensuspension) eine erniedrigte CAP-Hemmbarkeit von 86 % sowie eine erheblich erhöhte Cycloheximid-Empfindlichkeit von ca. 14 %; der ^{14}C-Phe-Einbau in mitochondrial synthetisiertes Protein, der im Ansatz ohne Hemmstoffzusatz gemessen wurde, verminderte sich vergleichsweise um ungefähr 25 %. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Versuch 5.2.1.3. und stützt somit die Vermutung, daß die mitochondriale Proteinsynthese in vitro durch hyaloplasmatische Faktoren negativ beeinflußt wird. Fraglich ist, ob gleiche Faktoren die veränderten Chloramphenicol- bzw. Cycloheximid-Hemmraten bewirken; sie würden damit eine mikrosomale Verunreinigung der Mitochondriensuspension vortäuschen, die infolge Verwendung derselben Organellenpräparation mit gleichem Reinheitsgrad ausgeschlossen werden kann.
Nach Vorinkubation der Mitochondriensuspension sinkt der ^{14}C-Phenylalaineinbau bezüglich des Kontrollwertes (ohne Vorinkubation 6600 dpm = 100 %) um 50 %, bei gleichem Vorgehen mit Hyaloplasma um 23 % ab; Chloramphenicol hemmt den Aminosäureeinbau zu 85 % bzw. 87 %, Cycloheximid zu 15 % bzw. 13 %. Das läßt abermals vermuten, daß Hyaloplasma als Störfaktor bei der mitochondrialen Proteinsynthese anzusehen ist; möglicherweise verbessern hyaloplasmatische Faktoren die Einbaubedingungen von ^{14}C-Phenylalanin in Protein für

	^{14}C-Phe-Einbau (dpm)		ø Hp ø Vk	+ Hp ø Vk	+ Hp + Vk Mch	+ Vk Hp	+ pH 5 ø Vk	+ Sup ø Vk	+ Stp ø Vk
0,1 ml Mitochondrien	6600 ± 75	=	100 %	- 25 % ≙ 100%	- 50 % ≙ 100%	- 23 % ≙ 100%	- 25 % ≙ 100%	- 25 % ≙ 100%	- 34 % ≙ 100%
+ CAP	90	-	98 %	- 86 %	- 85 %	- 87 %	- 87 %	- 85 %	- 98 %
+ Cycloheximid	6470	-	2 %	- 14 %	- 15 %	- 13 %	- 13 %	- 18 %	- 2 %

Mch = Mitochondrien

Hp = Hyaloplasma

Vk = Vorinkubation

Sup = Überstand

Stp = Standardpuffer

Tabelle 7

Einfluß von Hyaloplasma auf die mitochondriale Proteinsynthese; Hemmung durch CAP und Cycloheximid

Herstellung der Mitochondriensuspension, des Hyaloplasmas sowie der daraus gewonnenen pH 5-Fraktion + Überstand wie unter "Material und Methoden" beschrieben.

Hemmstoffkonzentration pro Ansatz: 200 µg CAP; 200 µg Cycloheximid

Vorinkubationszeit: Mitochondrien 10 Minuten; Hyaloplasma 20 Minuten

Inkubationszeit : 15 Minuten

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben. Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

verunreinigende Mikrosomen der Mitochondrienfraktion, was sich nach Zugabe von Chloramphenicol und Cycloheximid durch veränderte Hemmraten ausdrückt.

Um zumindest einige Komponenten des Hyaloplasmas aus dem Inkubationssystem zu entfernen, ist vergleichsweise eine Enzymfraktion eingesetzt worden, die bei pH 5 durch Fällung aus Hyaloplasma gewonnen wurde; ebenso wurde mit dem Überstand verfahren, der bei der Präparation dieser pH 5-Fraktion resultierte (Präparationsvorgang siehe "Material und Methoden").

Weder bei Verwendung der pH 5-Fraktion noch mittels des präparativ gewonnenen Überstandes waren höhere Chloramphenicol- bzw. niedrigere Cycloheximid-Hemmraten zu messen, als bei Hyaloplasmazusatz im Inkubat resultierten (Tabelle 7); somit bringt die Verwendung einer dieser Fraktionen zur Differenzierung mikrosomaler von mitochondrialer Proteinsynthese aus "Homogenat" gegenüber Hyaloplasma keinen Vorteil.

Mit Hyaloplasma werden Kalium-, Magnesium-, Chlor- und Acetat-Ionen in das Inkubationssystem eingebracht (Präparation mit Standardpuffer). Um herauszufinden, ob der beobachtete Hemmeffekt von Hyaloplasma auf dessen Homogenisiermedium beruht, wurde im Inkubationsansatz Hyaloplasma durch Standardpuffer ersetzt; jeweils 2 Proben wurde wiederum Chloramphenicol bzw. Cycloheximid zugesetzt.

Im Vergleich zu allen vorangegangenen Versuchen, bei denen Hyaloplasma oder dessen Komponenten (pH 5-Fraktion; Überstand) zur Inkubation verwendet wurden, wurde die mitochondriale Proteinsynthese durch Chloramphenicol jetzt wieder zu 98 % gehemmt, der Rest war Cycloheximid-empfindlich. Gleiche Hemmraten konnten schon im Hyaloplasma-freien Inkubationsansatz gemessen werden; dort resultierte hingegen ein um ein Drittel höherer ^{14}C-Phenylalaineinbau, wenn Mitochondrien ohne Hemmstoff inkubiert wurden (Tabelle 7). Dies zeigt einerseits, daß ein oder mehrere Ionen des Homogenisiermediums für Hyaloplasma die mitochondriale Proteinsynthese hemmen; möglicherweise geschieht dies über eine Veränderung der K^+- oder Mg^{++}-Ionenkonzentration im Inkubationsansatz. Zum anderen wird deutlich, daß die in den vorangegangenen Versuchen immer wieder gemessenen veränderten Hemmraten für Chloramphenicol bzw. Cyclo-

heximid keinesfalls auf diese zusätzlich in das System eingebrachten Ionen zurückzuführen sind.
Aus der Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuche, den Einfluß von Hyaloplasma auf die mitochondriale Proteinsynthese sowie deren Hemmung durch Chloramphenicol und Cycloheximid zu klären, folgt:

1. Hyaloplasmatische Faktoren verbessern vermutlich die Einbaubedingungen für die Mitochondrienfraktion verunreinigende Mikrosomen. Gegenüber Inkubationsansätzen ohne Hyaloplasma, in denen die Mikrosomen nur in sehr geringem Maße ^{14}C-Phenylalanin in Protein einbauen, und damit zwangsläufig niedrige Hemmraten nach Cycloheximidzusatz resultieren müssen, werden somit höhere Hemmraten nach Zugabe dieses Antibiotikums gemessen. Diese in Prozent angegebenen Hemmraten dürfen nicht als prozentual die Mitochondrienfraktion verunreinigende Mikrosomenfraktion verstanden werden, da ihre Proteinsynthese-Aktivität in vitro - und direkt abhängig davon die prozentuale Hemmung durch Cycloheximid - allein von den Versuchsbedingungen abhängig ist.
2. Ein oder mehrere Ionen (K^+; Mg^{++}; Cl^-; Ch_3COO^-) des Homogenisiermediums für Hyaloplasma hemmen bei unseren Versuchsbedingungen die mitochondriale Proteinsynthese zu 34 %.

Um die Versuchsbedingungen zu verbessern, sollte Hyaloplasma künftig nicht in Standardpuffer präpariert werden; wir haben für alle folgenden Versuche 0,25 M Saccharose + TES Puffer als Homogenisiermedium gewählt.

5.2.10. Einfluß von Saccharose-Hyaloplasma auf die mikrosomale Proteinsynthese; Vergleich zweier Suspensionsmedien für Mikrosomen

Hinsichtlich der möglichen Verwendung von Saccharose-Hyaloplasma zur Differenzierung mikrosomaler von mitochondrialer Proteinsynthese aus von diesen Zellpartikeln zusammengesetztem "Homogenat" wurde untersucht, welchen Effekt Saccharose-Hyaloplasma auf die in vitro Proteinsynthese an Mikrosomen hat. Zum anderen sind Mikrosomen anstatt in Standardpuffer in 0,25 M Saccharose + 3 mM $MgCl_2$ und TES Puffer suspendiert und inkubiert worden. Dies erfolgte im

Hinblick auf die gemeinsame Inkubation mit Mitochondrien, um alle die mitochondriale Proteinsynthese hemmenden Ionen des Standardpuffers aus dem Inkubationsansatz zu eliminieren. Dazu haben wir frisch isolierte Mikrosomen wie üblich in Standardpuffer aufgenommen und zusammen mit Standardpuffer-Hyaloplasma (Ansatz A) sowie mit Saccharose-Hyaloplasma (Ansatz B) zur in vitro Proteinsynthese eingesetzt; gleichermaßen wurde mit 2 weiteren Proben verfahren, die jedoch Mikrosomen in 0,25 M Mg^{++}-Saccharose suspendiert enthielten (Ansatz C und Ansatz D). Zur Kontrolle der Fermentabhängigkeit wurden jeweils 0,05 ml und 0,1 ml der entsprechenden Mikrosomensuspension in die Inkubationsansätze einpipettiert.

In Tabelle 8 sind die ^{14}C-Phe-Einbauraten aufgeführt, die in den einzelnen Inkubationsansätzen gemessen werden konnten; zusätzlich ist die spezifische Aktivität der jeweiligen Mikrosomensuspension bestimmt worden.
Die in den Ansätzen A und B einerseits bzw. C und D andererseits gemessenen Einbauraten und spezifischen Aktivitäten weichen hinsichtlich der Höhe nur geringfügig bzw. nicht voneinander ab; signifikant ist jedoch der um ca. 50 % höhere ^{14}C-Phe-Einbau, der bei Fermentabhängigkeit in den Ansätzen C und D gegenüber Ansatz A und Ansatz B resultierte. Die spezifische Aktivität der dort verwendeten Mikrosomensuspension erhöhte sich vergleichsweise um 150 %. Das bedeutet, daß die Aktivität der Mikrosomen zur in vitro Proteinsynthese erheblich gesteigert wird, wenn die Organellen in Mg^{++}-Saccharose anstatt in Standardpuffer suspendiert werden. Saccharose-Hyaloplasma verbessert die Versuchsbedingungen für die in vitro Proteinsynthese mit Mikrosomen nicht; trotzdem wurde es künftig verwendet, da infolge der Elimination aller Ionen des Standardpuffers eine Steigerung der mitochondrialen Proteinsynthese nach Saccharose-Hyaloplasmazusatz erwartet werden konnte.
Dieses Beispiel zeigt, welche Schwierigkeiten bei der Übernahme von Versuchsbedingungen aus der Literatur resultieren können. Wir hatten vermutet, daß die Inkubationsbedingungen für Mikrosomen optimal seien; es hat sich jedoch gezeigt, daß die Zusammensetzung des übernommenen Ionenmilieus zur mikrosomalen Proteinsynthese in vitro nicht ideal gewesen ist.

Ansatz	ml Mikrosomensuspension	^{14}C-Phenylalaineinbau	spezifische Aktivität
A	0,10 ml	18050	11,5
	0,05 ml	7950	
B	0,10 ml	17600	11,5
	0,05 ml	7400	
C	0,10 ml	26360	28,7
	0,05 ml	13200	
D	0,10 ml	27720	28,7
	0,05 ml	13630	

Tabelle 8

Einfluß von Saccharose-Hyaloplasma auf die mikrosomale Proteinsynthese; Vergleich zweier Suspensionsmedien für Mikrosomen

Ansatz A = Mikrosomensuspension in Standardpuffer; Hyaloplasmapräparation in Standardpuffer

Ansatz B = Mikrosomensuspension in Standardpuffer; Hyaloplasmapräparation in 0,25 M Saccharose + TES

Ansatz C = Mikrosomensuspension in 0,25 M Saccharose + 3 mM $MgCl_2$ + TES; Hyaloplasmapräparation in Standardpuffer

Ansatz D = Mikrosomensuspension in 0,25 M Saccharose + 3 mM $MgCl_2$ + TES; Hyaloplasmapräparation in 0,25 M Saccharose + TES

Inkubationszeit: 9 Minuten

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben, die spezifische Aktivität in pmole ^{14}C-Phenylalanin eingebaut pro mg RNA x min. Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

5.2.11. Versuch zur Messung von mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität aus einem von diesen Zellpartikeln zusammengesetzten "Homogenat"

Es wurde die in vitro Proteinsynthese von Mikrosomen, Mitochondrien sowie eines Mikrosomen-Mitochondriengemisches gemessen. In alle Inkubationsansätze wurde Saccharose-Hyaloplasma eingesetzt. Die Proteinsynthese-Aktivität der einzelnen Organellensuspensionen sowie die des aus Mikrosomen und Mitochondrien zusammengesetzten "Homogenates" wurde jeweils durch Chloramphenicol und Cycloheximid gehemmt, um anhand der resultierenden Einbauraten die mikrosomale und die mitochondriale Proteinsynthese-Aktivität an der "Homogenatproteinsynthese" zu identifizieren. Um mit dieser Methode gültige Ergebnisse zu erhalten, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Die Organellensuspensionen müssen von hohem Reinheitsgrad sein; insbesondere sollte die Mitochondrienfraktion frei von Zellkernen sein, da deren Proteinsynthese-Aktivität durch Cycloheximid hemmbar und somit von der gleichfalls Cycloheximid-empfindlichen mikrosomalen Proteinsynthese nicht unterscheidbar ist.
2. Die Antibiotika Chloramphenicol und Cycloheximid sollten selektiv die mitochondriale- bzw. die mikrosomale Proteinsynthese hemmen.

Den Reinheitsgrad unserer verwendeten Mikrosomen- bzw. Mitochondrienfraktionen überprüften wir anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen (siehe S. 10 Abb. 2 a/b und S. 14 Abb. 4 a/b); zum anderen zeigten die vorangegangenen Versuche mit isolierten Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen, daß Cycloheximid und Chloramphenicol geeignete Hemmstoffe zur Differenzierung mikrosomaler von mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität sind.

Wie Abbildung 18 zeigt, ist die Proteinsynthese-Aktivität des "Homogenates" die Summe aus mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese. Dabei erreicht die mitochondriale Proteinsynthese einen höheren ^{14}C-Phenylalaninein\-bau, als bei Inkubation von Mitochondrien im Inkubationssystem ohne Hyaloplasmazusatz resultierte (vgl. Tab. 7).

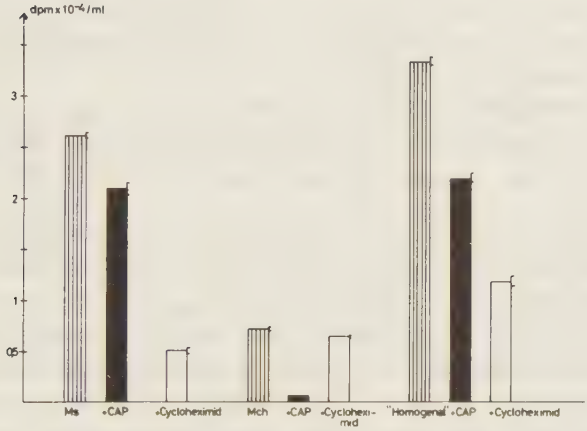


Abb. 18: In vitro Proteinsynthese von Mikrosomen (Ms), Mitochondrien (Mch) sowie von "Homogenat"; Messung des ^{14}C-Phe-Einbaues nach Hemmung durch CAP und Cycloheximid

Herstellung der Organellensuspensionen und Inkubationsansätze (+ Saccharose-Hyaloplasma) wie unter "Material und Methoden" beschrieben.

Suspensionsmedium für Mikrosomen war 0,25 M Saccharose + 3 mM $MgCl_2$ + TES.

Hemmstoffkonzentration pro ml Ansatz: 200 µg CAP; 200 µg Cycloheximid

Inkubationszeit: 15 Minuten

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

Diese Steigerung des Aminosäure-Einbaues sollte folgendermaßen zu erklären sein:

1. Die Elimination der Ionen des Standardpuffers aus dem Inkubationssystem (Ersatz von Standardpuffer als Homogenisiermedium für Hyaloplasma durch Saccharose) ermöglicht gegenüber allen vorausgegangenen Versuchen mit Mitochondrien und Hyaloplasma einen ebenso hohen ^{14}C-Phe-Einbau, wie im Inkubationssystem ohne Hyaloplasmazusatz gemessen werden konnte.
2. Durch Zusatz hyaloplasmatischer Faktoren (in Form von Saccharose-Hyaloplasma) wird die Aktivität der Mikrosomen der Mitochondrienfraktion zur Proteinsynthese in vitro erhöht; somit resultiert ein zusätzlicher ^{14}C-Phe-Einbau, der oben beschriebene Steigerung des Gesamteinbaues ausmacht.
   Die Aminosäure-Einbaubedingungen für Mitochondrien, die zusammen mit Mikrosomen inkubiert werden sollen, sollten somit bei Verwendung von Saccharose-Hyaloplasma optimal sein.

Der jeweils Chloramphenicol-empfindliche Teil der mikrosomalen und mitochondrialen Proteinsynthese ergeben nach Addition eine Fraktion, die ebenso groß wie die CAP-hemmbare Fraktion der "Homogenatproteinsynthese" ist; entsprechendes gilt für die durch Cycloheximid hemmbaren Fraktionen mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese. Somit repräsentieren die Chloramphenicol-hemmbare Fraktion des "Homogenates" den Anteil der mitochondrialen Proteinsynthese-Aktivität, die Cycloheximid-hemmbare Fraktion den Anteil der mikrosomalen Proteinsynthese-Aktivität an der "Homogenatproteinsynthese".

5.3. Messung von mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität aus postnuclearem Überstand unter Verwendung der differenzierenden Hemmstoffe Chloramphenicol und Cycloheximid

Nach Abschluß der notwendigen Vorversuchsserien, in denen isolierte Zellpartikel zur Proteinsynthese in vitro wiedervereinigt wurden, und nach Austestung der dazu erforderlichen Bedingungen wurde jetzt postnuclearer Überstand über einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert und die ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die Proteinsynthese in diesem Homogenat aus Mikrosomen, Mitochondrien und Überstand wurde durch Cycloheximid und Chloramphenicol gehemmt, um anhand der resultierenden Einbauraten den prozentualen Anteil mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität an der Proteinsynthese des postnuclearen Überstandes zu identifizieren. Zusätzliches Hyaloplasma wurde in das in vitro System nicht eingesetzt.

In Abbildung 19a sind 3 Einbaukurven aufgetragen, von denen jede im Folgenden diskutiert werden soll; zusätzlich sind in Abbildung 19b der Chloramphenicol- und Cycloheximid-hemmbare Teil der Proteinsynthese aufgezeichnet worden, um einen mengenmäßigen Überblick über die Proteinsynthese-Aktivität von Mitochondrien und Mikrosomen an der Gesamt-Proteinsynthese zu verschiedenen Inkubationszeiten zu bekommen.
Die Kurve, die die Proteinsynthese-Aktivität des postnuclearen Überstandes wiedergibt (Symbol •———•), steigt bis zu 5 Minuten Inkubation steil linear an, ehe sie allmählich abknickt. Dieser Kurvenverlauf ähnelt im Anfangsteil der zweiten Kurve (Symbol •------•), die nach Hemmung durch Chloramphenicol und Auftragung der dann gemessenen Einbauraten resultierte; sie gibt die Einbaukurve für die mikrosomale Proteinsynthese im postnuclearen Überstand wieder. Der Unterschied im Kurvenbild besteht vor allem darin, daß die durchgezogene Kurve (Proteinsynthese des postnuclearen Überstandes) im Gegensatz zu der gestrichelten (mikrosomale Proteinsynthese) auch nach 30 Minuten Inkubation weiterhin leicht ansteigt. Das bedeutet, daß nach dieser Inkubationszeit der endogene "messenger" der Mikrosomen verbraucht ist, während im postnuclearen Überstand weiterhin

Protein synthetisiert wird. Da die Zellkernfraktion aus der eingesetzten Suspension herauszentrifugiert worden ist, ist dieser Zuwachs größtenteils auf mitochondriale Proteinsynthese zurückzuführen, wie auch Tabelle 9 zeigt. Bei Berücksichtigung der Einbaukurve, die nach Hemmung durch Cycloheximid resultiert (Symbol o———o), wird diese Aussage bekräftigt. Die Kurve, die den mitochondrialen Anteil an der Gesamt-Proteinsynthese wiedergibt, steigt bis zu 10-15 Minuten stetig an, ehe sie abknickt; während des Inkubationszeitraumes von 30 - 60 Minuten hat sie nahezu die gleiche Steigung wie die Proteinsynthese-Aktivität des postnuclearen Überstandes darstellende Kurve. Tabelle 9 gibt einen zahlenmäßigen Überblick über das Versuchsergebnis. Danach wird an den Mikrosomen im Zeitraum 0 - 15 Minuten Inkubation 94,8 %, in Mitochondrien 5,2 % des insgesamt nachzuweisenden Proteins synthetisiert. Während der folgenden 15 Minuten Inkubation wächst die Proteinsynthese im postnuclearen Überstand um 14,5 %. Der Anteil der mikrosomalen Proteinsynthese an dieser Zuwachsrate beträgt zwischen 15 + 30 Minuten 72,9 %, der der mitochondrialen Proteinsynthese 27,1 %. Mit andauernder Inkubation verschiebt sich die Relation immer mehr zugunsten der mitochondrialen Proteinsynthese, da der endogene "messenger" der Mikrosomen fortlaufend verbraucht wird; nach 45 Minuten sind sie nur noch zu 4 % an der Proteinsynthese beteiligt (Mitochondrien zu 96 %), Im Inkubationsintervall von 45 - 60 Minuten ist schließlich kein weiterer ^{14}C-Phe-Einbau durch Mikrosomen mehr nachweisbar. Demzufolge wird ab 30 Minuten Inkubation im postnuclearen Überstand Protein nahezu ausschließlich in Mitochondrien synthetisiert.

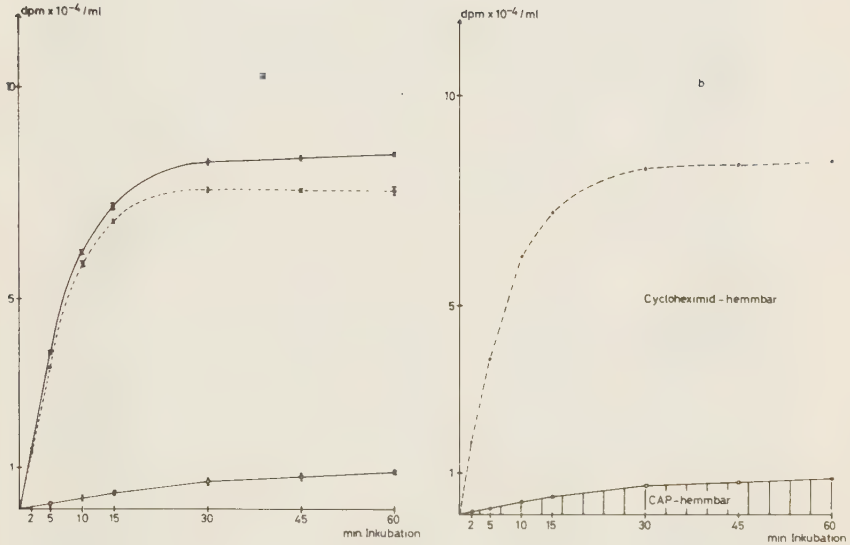


Abb. 19a/19b: Hemmung der Proteinsynthese mit postnuclearem Überstand durch CAP und Cycloheximid; Messung der ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten zu verschiedenen Inkubationszeiten

Postnuclearer Überstand (•———•); postnuclearer Überstand + 200 µg CAP (•-------•); postnuclearer Überstand + 200 µg Cycloheximid (o———o). Gewinnung des postnuclearen Überstandes und Inkubationsansatz (ø Hyaloplasma)wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Die Suspension hatte einen Proteingehalt von 21,6 mg/ml.
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

	^{14}C-Phe-Einbau	% Ps-Aktivität t = 15 min	% Ps-Aktivität t = 30 min	% Ps-Aktivität t = 45 min	% Ps-Aktivität t = 60 min
Postnuclearer Überstand	71800	≙ 100	+ 14,5 ≙ 100	+ 1,5 ≙ 100	+ 1,0 ≙ 100
Cycloheximid-hemmbare Fraktion (Ms)	68070	94,8	72,9	4,0	--
CAP-hemmbare Fraktion (Mch)	3730	5,2	27,1	96	100

Ms = Mikrosomenfraktion
Mch = Mitochondrienfraktion
Ps = Proteinsynthese

Tabelle 9

Prozentualer Anteil mikrosomaler und mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität an der Proteinsynthese im postnuclearen Überstand während des Inkubationszeitraumes 0 - 60 Minuten.

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben. Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

6. Schlußfolgerungen

Stehen zur Messung von Proteinsyntheseraten einzelner Zellpartikel in vitro nur geringe Mengen Gewebe zur Verfügung, wie z.B. bei Warmblüterembryonen während der Phase der Organogenese, so ist es sehr schwierig oder nicht durchführbar, gereinigte Zellfraktionen zu isolieren.
Wir haben uns daher bemüht, Versuchsbedingungen zu schaffen, durch die aus Homogenaten die Messung von Proteinsyntheseraten einzelner Zellpartikel möglich und eine vorherige Zellfraktionierung somit überflüssig wird.
Als Hilfsmittel standen uns dafür zur Verfügung:

1. differenzierende Hemmstoffe
2. Unterschiede in der Kinetik des Einbaues der einzelnen Zellpartikel, wahlweise mit Hilfe von Vorinkubation
3. Auswahl der Inkubations- und Isolierungsmedien, um möglichst einen optimalen Einbau aller auszutestenden Zellpartikel zu gewährleisten.

Da die für Zellkerne beschriebene Proteinsynthese nicht durch einen spezifischen Hemmstoff unterdrückbar ist, mußten wir diesen, wenn auch geringen, Anteil an der Gesamtproteinsynthesekapazität der Zelle aus dem Homogenat beseitigen. Das läßt sich durch eine einzige, kurze Zentrifugation bei 600 x g erreichen. Aus dem Sediment lassen sich auch bei kleineren Materialmengen ausreichend "reine" Kernfraktionen isolieren, um deren Proteinsynthese-Aktivität in vitro zu messen.
Der nach der 600 x g Zentrifugation resultierende postnucleare Überstand enthält in der Relation, wie sie in der Zelle vorlag, Mitochondrien, Mikrosomen und Überstand (Hyaloplasma). Zur Differenzierung mikrosomaler von mitochondrialer Proteinsynthese aus diesem postnuclearen Überstand standen uns 2 verschiedene Inkubationssysteme zur Verfügung. Das eine sollte optimale Aminosäure-Einbaubedingungen für die Mikrosomen gewährleisten (WIEDEMANN 1972), während das zweite spezifisch zur Inkubation von Mitochondrienfraktionen von NEUPERT geschaffen worden war. Der Unterschied zwischen beiden Medien besteht in verschiedenen ATP, PEP und EDTA-Konzentrationen im

Inkubationsansatz sowie der Verwendung von Hyaloplasma durch WIEDEMANN, welches zur mikrosomalen Proteinsynthese in vitro benötigt wird. JÄGER aus unserer Arbeitsgruppe verglich in unveröffentlichten Versuchen die ^{14}C-Phenylalanin-Einbaubedingungen von postnuclearem Überstand in beiden Inkubationssystemen, und stellte keinen Unterschied in der Höhe der jeweils resultierenden Proteinsyntheseraten fest. Da beide Medien optimale Einbaubedingungen für jeweils nur eine Zellfraktion bieten sollte, ließen diese Versuchsergebnisse keine endgültige Aussage über die Anwendbarkeit eines dieser Inkubationssysteme zur Differenzierung mikrosomaler von mitochondrialer Proteinsynthese-Aktivität aus postnuclearem Überstand zu. Wir haben deshalb versucht, optimale Aminosäure-Einbaubedingungen für die Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion auszutesten. Dazu inkubierten wir isolierte Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen einzeln und gemeinsam in einem veränderten Inkubationsmedium (siehe "Material und Methoden", Abschnitt 4.5.), dem Hyaloplasma zugesetzt war. Dabei zeigte sich, daß die mitochondriale Proteinsynthese durch uns unbekannte Komponenten des Hyaloplasmas gehemmt wurde. Wir haben daher den Einfluß von löslichen Faktoren in Form von Hyaloplasma auf isolierte Mitochondrienfraktionen ausgetestet.
Die Versuchsergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 20 wiedergegeben und können folgendermaßen erklärt werden:

1. Ein oder mehrere Ionen des Homogenisiermediums für Hyaloplasma (Standardpuffer) hemmen die mitochondriale Proteinsynthese zu 34 % (vgl. Säule I mit Säule II und Säule III).
2. Hyaloplasmatische Faktoren verbessern die Einbaubedingungen für die Mitochondrienfraktion verunreinigende Mikrosomen; es resultiert somit eine gesteigerte mikrosomale Proteinsynthese, die nach Hemmung durch Cycloheximid dargestellt werden kann (Säule III und Säule IV).
3. Nach Elimination der Standardpufferionen aus dem Inkubationssystem infolge Verwendung von Saccharose-Hyaloplasma resultieren optimale Einbaubedingungen für isolierte Mitochondrienfraktionen (Säule IV).

Hinsichtlich der Verwendung von Saccharose-Hyaloplasma zur Differenzierung mikrosomaler von mitochondrialer Proteinsynthese aus "Homo-

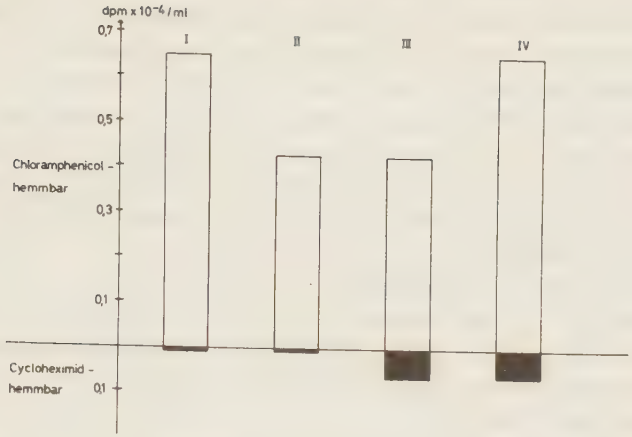


Abb. 20: Einfluß von Hyaloplasma auf die Proteinsynthese mit Mitochondrien; Hemmung durch CAP und Cycloheximid

Die Abbildung zeigt die ^{14}C-Phenylalanin-Einbauraten von Mitochondrien, die wahlweise mit und ohne Hyaloplasma sowie mit dessen Homogenisiermedium Standardpuffer inkubiert wurden. Die Ansaätze enthielten CAP und Cycloheximid, um die mikrosomale Proteinsynthese von der mitochondrialen Proteinsynthese abgrenzen zu können.

Säule I : Mitochondrien ø Hyaloplasma
Säule II : Mitochondrien + Standardpuffer
Säule III : Mitochondrien + Hyaloplasma (Homogenisiermedium Standardpuffer)
Säule IV : Mitochondrien + Hyaloplasma (Homogenisiermedium Saccharose)

Herstellung der Mitochondriensuspension, des Hyaloplasmas und Inkubationsansatz wie unter "Material und Methoden" beschrieben.
Hemmstoffkonzentration pro Ansatz: 200 µg CAP; 200 µg Cycloheximid
Inkubationszeit: 15 Minuten
Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben. Alle Werte stellen Mittelwerte von Doppelbestimmungen dar (Streuung kleiner als 10 %).

genat" wurde untersucht, welchen Effekt die Verminderung der Ionenkonzentration im Inkubationsansatz infolge Verwendung von Saccharose-Hyaloplasma auf die in vitro Proteinsynthese an Mikrosomen hat. Dabei zeigte sich, daß mit Saccharose-Hyaloplasma die Aminosäure-Einbaubedingungen nicht verbessert oder verschlechtert wurden; die Proteinsynthese-Aktivität der Mikrosomen konnte jedoch um 150 % gesteigert werden, wenn die Zellorganellen wie im postnuclearen Überstand in Mg^{++}-Saccharose anstatt in Standardpuffer suspendiert in das System eingesetzt wurden.

Nach Abschluß dieser Versuchsreihen stand uns ein in vitro-System zur Verfügung, in dem "Homogenat" und postnuclearer Überstand inkubiert werden konnten, und die Bestimmung von mikrosomaler- und mitochondrialer Proteinsynthese mit Hilfe von Chloramphenicol und Cycloheximid möglich war.

Am Ende einer Arbeit zur Erstellung einer Methode steht die Frage nach der Anwendbarkeit derselben.

Abbildung 19a zeigt anhand der dort aufgetragenen Einbaukurven, daß die mikrosomale Proteinsynthese im postnuclearen Überstand nach 15 Minuten Inkubation ca. 18 mal aktiver als die mitochondriale Proteinsynthese war. Um den Anteil der mitochondrialen Proteinsynthese hervorzuheben, sollte ihre Messung erst dann erfolgen, wenn die Mikrosomen im postnuclearen Überstand nur noch wenig aktiv sind, also z.B. nach 15 Minuten Vorinkubation. Wie inzwischen auch von JÄGER und BASS (1975) gezeigt werden konnte, gelingt durch dieses Verfahren eine deutlichere Darstellung der mitochondrialen Proteinsynthese-Aktivität im postnuclearen Überstand (Abb. 21 a/b).

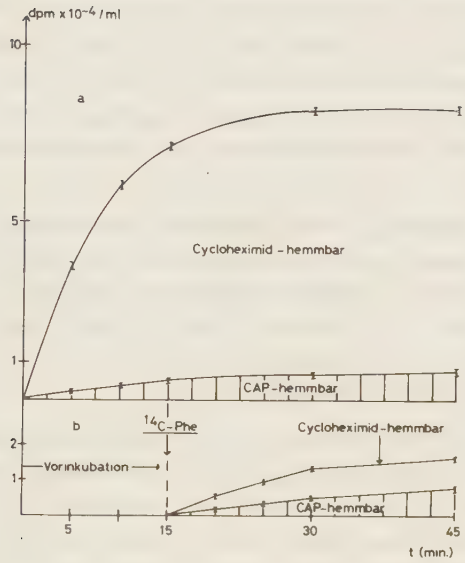


Abb. 21: Messung von mikrosomaler- und mitochondrialer Proteinsynthese aus postnuclearem Überstand unter Verwendung der differenzierenden Hemmstoffe Chloramphenicol und Cycloheximid

a) ohne Vorinkubation

b) nach 15 Minuten Vorinkubation

Gewinnung des postnuclearen Überstandes und Inkubationsansatz (øHyaloplasma) wie unter "Material und Methoden" beschrieben.

Hemmstoffkonzentration pro ml Ansatz: 200 µg CAP; 200 µg Cycloheximid

Die Suspension hatte einen Proteingehalt von 21,6 mg/ml.

Die Einbauraten sind in dpm/ml Ansatz angegeben.

7. Zusammenfassung

1. Bei Inkubation von postnuclearem Überstand in der Verdünnung 1 + 7 (Gewicht/Volumen) ist zwischen Proteinsyntheserate und eingesetzter "Ferment"menge eine lineare Beziehung nachweisbar.

2. Cycloheximid und Chloramphenicol sind geeignete Hemmstoffe , um die ribosomale bzw. mitochondriale Proteinsynthese-Aktivität im postnuclearen Überstand vollständig zu hemmen. Mit Puromycin gelingt eine absolute Hemmung der Proteinsynthese im postnuclearen Überstand.

3a. Die Proteinsynthese-Aktivität eines aus Mikrosomen und Mitochondrien zusammengesetzten "Homogenates" wurde durch 200 µg Cycloheximid und 200 µg Chloramphenicol pro ml Ansatz gehemmt. Es resultierten eine Cycloheximid-hemmbare und Chloramphenicol-hemmbare Fraktion, die Ausdruck der mikrosomalen bzw. mitochondrialen Proteinsynthese-Aktivität sind.

3b. Die Proteinsynthese-Aktivität in postnuclearem Überstand wurde durch Chloramphenicol bzw. Cycloheximid gehemmt und auf diese Weise der prozentuale Anteil der ribosomalen und mitochondrialen Proteinsynthese zu verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Bis zu 30 Minuten Inkubation synthetisieren die Ribosomen den überwiegenden Teil des Proteins im postnuclearen Überstand, danach ist ihr endogener "messenger" verbraucht; die dann noch fortwährende Proteinsynthese erfolgt in Mitochondrien.

4. Es wurde ein Inkubationssystem ausgetestet, in dem sich die ^{14}C-Phe-Einbauraten isolierter Zellfraktionen (Zellkerne, Mikrosomen und Mitochondrien) zu verschiedenen Inkubationszeiten addieren lassen.

5. Bei unseren Versuchsbedingungen konnte ein RNA-Transport aus isolierten Zellkernen in das Inkubationsmedium nachgewiesen werden; diese "ausgeschleuste" RNA hat die mikrosomale Proteinsynthese nach Verbrauch des endogenen "messengers" nicht stimulieren können.

6. Es wurde der Einfluß von Hyaloplasma auf die mitochondriale Proteinsynthese untersucht. Dabei ergab sich, daß hyaloplasmatische Faktoren die Einbaubedingungen für die Mitochondrienfraktion verunreinigende Mikrosomen verbessern. Gegenüber Inkubationsansätzen ohne Hyaloplasma, in denen die Mikrosomen nur in sehr geringem Maße ^{14}C-Phenylalanin in Protein einbauen, werden somit höhere Hemmraten nach Zugabe von Cycloheximid gemessen.

7. Ein oder mehrere Ionen des zur Gewinnung von Hyaloplasma benutzten Homogenisiermediums (Standardpuffer) hemmen bei unseren Versuchsbedingungen die mitochondriale Proteinsynthese zu 34 %.

8. Die Proteinsynthese-Aktivität einer Mikrosomenfraktion wird um ca. 150 % gesteigert, wenn die Organellen in Mg^{++}-Saccharose anstatt in Standardpuffer suspensiert werden.

Verzeichnis der Abkürzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden

RNA	: Ribonucleinsäure
t-RNA	: transfer-Ribonucleinsäure
m-RNA	: messenger-Ribonucleinsäure
F-met-t-RNA	: Formyl-methionyl-transfer-Ribonucleinsäure
DNA	: Desoxyribonucleinsäure
UAA	: Uridin-Adenosin-Adenosin
UAG	: Uridin-Adenosin-Guanosin
UGA	: Uridin-Guanosin-Adenosin
CAP	: Chloramphenicol
TMPD	: N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenyldiamin-dihydrochlorid
TES	: Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure (Puffersubstanz nach Good)
PPO	: PPO 2,5-Diphenyloxazol
POPOP	: Dimethyl-POPOP 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl)-Benzol

Literaturverzeichnis

ALLFREY, V.G., LITTAU, V.C. & MIRSKY, A.E.: Methods for the purification of thymus nuclei and their application to studies of nuclear protein synthesis
In: Journal Cell. Biol. 21, 1964, p. 213-231

ASHWELL, M.A. & WORK, T.S.: Contrasting effects of Cycloheximide on mitochondrial protein synthesis 'in vivo' and 'in vitro'
In: BBRC 32, 1968, p. 1006

BEATTIE, D.S., BASFORD, R.E. & KORITZ, S.B.: The inner membrane as the site of the in vitro incorporation of L-^{14}C-Leucine into mitochondrial protein
In: Biochemistry 6, 1967, p. 3099

BRAUN, G.A., MARSH, J.B., DRABKIN, D.L.: Amino acid incorporation into protein by liver mitochondria from nephrotic and partially hepatectomized rats
In: BBA 72, 1963, p. 645-647

BRENNER, S., BARNETT, L., KATZ, E.R., CRICK, F.H.C.:
UGA: a third nonsense triplet in the genetic code
In: Nature 213, 1967, p. 449

BRENNER, S., STRETTON, A.O.W., KAPLAN, S.: Genetic code: The "nonsense" triplets for chain termination and their suppression
In: Nature 206, 1965, p. 994-998

BROT, N., ERTEL, R., WEISSBACH, H.: Effect of a soluble transfer factor on the reaction of aminoacyl-t-RNA with Puromycin
In: BBRC 31, 1968, p. 563-570

BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid
In: Biochem. J. 62, 1956, p. 315-323

CLARK, B.F.C., MARCKER, K.A.: The role of N-formyl-methionyl-s-RNA in protein biosynthesis
In: JMB 17, 1966, p. 394

CLAUDON, D.B., HOLBROOK, A.A.: Fatal aplastic anemia associated with Chloramphenicol therapy; report of 2 cases
In: JAMA 149, 1952

ERBE, R.W., LEDER, P.: Initiation and protein synthesis: translation of di- and tri-codon messengers
In: BBRC 31, 1968, p. 789-803

ERTEL, R., BROT, N., REDFIELD, B., ALLENDE, J.E., WEISSBACH, H.: Binding of Guanosin 5'-triphosphate by soluble factors required for polypeptide synthesis
In: PNAS 59, 1968, p. 861-868

ESTABROOK, R.W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios
In: Methods in Enzymology Vol.X. Acad.Press 1967, p. 41-47

FALVEY, A.K., STAEHELIN, T.: Structure and function of mammalian ribosomes
I. Isolation and characterization of active liver ribosomal submits
In: JMB 53, 1970, p. 1-19

FERNANDEZ-MUNÔZ, R., MONRO, R.E., TORRES-PINEDO, R. & VAZQUEZ, D.: Studies on the Chloramphenicol, Lincomycin and Erythromycin sites
In: Eur. Journ. Biochem. 23, p. 185-193

GHOSH, H.P., SÖLL, D., KHORANA, H.G.: Studies on polynucleotides LXVII. Initiation of protein synthesis in vitro as studied by using ribopolynucleotides with repeating nucleotide sequences as messengers
In: JMB 25, 1967, p. 275

GILBERT, W.: Polypeptide synthesis in Escherichia coli.
II. The polypeptide chain and s-RNA
In: JMB 6, 1963, p. 389

HACKENBROCK, C.R.: Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria
I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria
In: The Journal of Cell Biology 30, No. 2, 1966, p. 269-297

HAENNI, A.L., LUCAS-LENARD, J.: Stepwise synthesis of a tri-peptide
In: PNAS 61, 1968, p. 1363-1369

HOAGLAND, M.B., KELLER, E.B., ZAMECNIK, P.C.: Enzymatic carboxyl activation of amino acids
In: JBC 218, 1956, p. 345-358

ISHIKAWA, K., KURODA, C. & OGATA, K.: Release of ribonucleoprotein particles containing rapidly labelled ribonucleic acid from rat liver nuclei
Effect of Adenosin 5'-Triphosphat and some properties of particles
In: BBA 179, 1969, p. 316-331

JÄGER, E., BASS, R.: Chloramphenicol/Thiamphenicol and Cycloheximide as tools for the measurement of mitochondrial proteinsynthesis in vitro during organogenesis of rat embryos
In: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 1975, p. 161-173

KELLER, E.B., ZAMECNIK, P.C.: Effect of Guanosin diphosphate and triphosphate on the Incorporation of labelled amino acids into protein
In: JBC 221, 1956, p. 45

KOLAKOFSKY, D., OHTA, T., THACH, R.E.: Junction of the 50S ribosomal subunit with the 30S initiation complex
In: Nature 220, 1968a, p. 244-247

KONDO, M., EGGERTSSON, G., EISENSTADT, J., LENGYEL, R.: Ribosome formation from subunits: dependence on formyl-t-RNA in extracts from E. coli
In: Nature 220, 1968, p. 368-370

KORNER, A.: Influence of the pituitary glandon the incorporation of amino acids into liver mitochondrial protein
In: Exp. Cell. Res. 18, 1959. p. 594

KROON, A.M.: Inhibitors of mitochondrial protein synthesis
In: BBA 76, 1963, p. 165

LAMB, A., CLARK-WALKER, G., LINNANE, A.: The biogenesis of Mitochondria
IV. The differentiation of mitochondrial and cytoplasmatic protein synthesizing systems in vitro by antibiotics
In: BBA 161, 1968, p. 415-427

LOEB, J.N., HUBBEY, B.G.: Amino acid incorporation by isolated mitochondria in the presence of Cycloheximide
In: BBA 166, 1968, p. 745-748

LOGAN, R., FICQ, A., ERRERA, M.: The uptake of 8-^{14}C-Adenin and 2-^{14}C-Phenylalanine by rat liver nuclei in vitro
In: BBA (Amst.) 31, 1959, p. 402-408

MADEN, B.E.H., TRAUT, R.R., MONRO, R.E.: Ribosome-catalysed peptidyl transfer: the polyphenylalanine system
in: JMB 35, 1968, p. 333

MAGER, J.: Chloramphenicol and Chlortetracycline inhibition of amino acid incorporation into proteins in a cell free system from Tetrahymena pyriformis
in: BBA 38, 1960, p. 150-152

MANS, R.J., NOVELLI, G.D.: A convenient, rapid and sensitive method for measuring the incorporation of radioactive amino acids into protein
in: BBRC 3, 1960, p. 540

MONRO, R.E.: Catalysis of peptide bond formation by 50S ribosomal subunits from Escherichia coli
in: JMB 26, 1967, p. 147-151

MONRO, R.E., MADEN, B.E.H., TRAUT, R.R.: The mechanism of peptide bond formation in protein synthesis
in: D.Shugar (ed.) Symp.Fed.Europ.Biochem.Soc.Academic Press, Nex York 1967, p. 179

NATHANS, D.: Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of Puromycin into peptide chains
in: PNAS 51, 1964, p. 585

NEUBERT, D., OBERDISSE, E., BASS, R.: Biosynthesis and degradation of mammalian mitochondrial DNA
in: SLATER, E.C., TAGER, J.M., PAPA, S., QUAGLIARIELLO, E.: Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria ADRIATICA Ed., Bari, 1968

NEUPERT, W.: Inaugural-Dissertation 1967, München

NIERHAUS, D., NIERHAUS, K.: Identification of Chloramphenicol-binding protein in Escherichia coli ribosomes by partial reconstitution
in: PNAS 70, 1973, p. 2224-2228

NIRENBERG, M., MATTHAEI, J.H.: The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occuring or synthetic polyribonucleotides
in: PNAS 47, 1961, p. 1588-1602

NOMURA, M., LOWRY, C.V., GUTHRIE, C.: The initiation of protein synthesis: joining of the 50S ribosomal subunit to the initiation complex
In: PNAS 58, 1967, p. 1487

O'BRIEN, T.W., KALF, G.F.: Ribosomes from rat liver mitochondria
In: JBC 242, 1967, p. 2172-2185

OGUR, M., ROSEN, G.: The nucleic acids of plant tissue;
I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid
In: Archv. Biochem. 25, 1950, p. 262

PESTKA, S.: Studies on the formation of transfer ribonucleic acid ribosomes complexes.
V. On the function of a soluble transfer factor in protein synthesis
In: PNAS 61, 1968, p. 726-733

PONGS, O., BALD, R., ERDMANN, V.A.: Identification of Chloramphenicol-binding protein in Escherichia coli ribosomes by affinity labelling
In: PNAS 70, No. 8, 1973, p. 2229-2233

RASKAS, H.J.: Release of Adenovirus messenger RNA from isolated nuclei
In: Nature New Biology 233, 1971, p. 134-136

ROODYN, D.B., REIS, P.J., WORK, T.S.: Protein synthesis in mitochondria: requirements for the incorporation of radioactiv amino acids in mitochondrial protein
In: Biochem. Journal 80, 1961, p. 9-20

SAMBROOK, J.F., FAN, D.P., BRENNER, S.: A strong suppressor specific for UGA
In: Nature 214, 1967, p. 452-453

SARKAR, S., THACH, R.E.: Inhibition of formyl-methionyl-transfer RNA binding to ribosomes by Tetracycline
In: PNAS 60, 1968, p. 1479-1486

SCHNAITMAN, C., ERWIN, V.G., GREENAWALT, J.W.: The submitochondrial localization of monoamine oxydase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria
In: Journal Cell. Biol. 32, 1967, p. 719-735

SCHNEIDER, J.H.: Factors affecting the release of nuclear ribonucleic acid from the nucleus in vitro
In: JBC 234, No. 10, 1959, p. 2728-2732

SCHNEIDER, J.H.: The relation of nuclear RNA to RNA of other sub-cellular fractions as studied in vitro
In: BBA 47, 1961, p.107-113

SCHNEIDER, W.C., HOGEBOOM, G.H.: Cytochemical studies of mammalian tissues: the isolation of cell components by differential centrifugation. A review.
In: Cancer Res. 11, 1. 1951

SEBALD, W., BUCHER, T., OLBRICK, B., KAUDEWITZ, F.: Electrophoretic pattern of and amino acid incorporation in vitro into the insoluble mitochondrial protein of neurospora crassa wild type and mi-1 mutant
In: FEBS Letters 1, 1968, p. 235

SUBRAMANIAN, A.R., RON, E.Z., DAVIS, B.D.: A factor required for ribosome dissociation in Escherichia coli
In: PNAS 61, 1968, p. 761-767

TAKANAMI, M., YAN, Y.: The release of polypeptide chains from ribosome in cell free amino acid incorporating systems by specific combinations of bases in synthetic polyribonucleotides
In: PNAS 54, 1965, p. 1450-1458

TANAKA, N., KINOSHITA, T., MASUKAWA, H.: Mechanism of protein synthesis inhibition by fusidic acid and related antibiotics
In: BBRC 30, 1968, p. 278-283

TISSIERES, A., SCHLESSINGER, D., GROS, F.: Amino acid incorporation into protein by E. coli ribosomes
In: National Academy of Sciences 46, 1960

UEHLIN, M.: Evaluation of a possible action of Chloramphenicol/Thiamphenicol on microsomal/ribosomal protein synthesis from rat embryos
In: New approaches to the evaluation of abnormal embryonic development
11. Symposium on prenatal development Sept. 1975, Berlin
p. 542-549
Eds. D. Neubert/H.-J. Merker

UETE, T.: Comparison of amino acid incorporation into nuclear protein of rat liver and thymus in cell free systmes
In: J. Biochem. 61, Nr. 2, 1967, p. 251-257

VAZQUEZ, P., MONRO, R.E.: The effect of antibiotics on the properties of ribosomes
In: Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med. I, 1968, S. 569

VOLINI, J.F., GREENSPAN, I., EHRLICH, I., GONNER, I.A., FELSENFELD, O., SCHWARTZ, S.: Hematopoietic changes during administration of Chloramphenicol
In: JAMA 142, 1950, p. 1333

WEIGERT, M.G., GAREN, A.: Base composition of nonsense codons in E. coli
In: Nature 206, 1956, p. 992-994

WEIGERT, M.G., LANKA, E., GAREN, A.: Base composition of nonsense codons in E. coli; II. The N 2 codon UAA
In: JMB 23, 1967, p. 391-400

WEINSTEIN, L.: Antibiotics. V. Miscellaneous antimicrobial agents
In: The pharmacological basis of therapeutics (3rd edition)
Eds. L.S. GOODMAN & A. GILMAN, Macmillan, New York, 1965, p. 1260

WEISBERGER, A.S., ARMENTROUT, S., WOLFE, S.: Protein synthesis by reticulocyte ribosomes;
I. Inhibition of Polyuridylic acid - induced ribosomal protein synthesis by Chloramphenicol
In: PNAS 50, 1963, p. 86-92

WIEDEMANN, G.: Vergleichende Untersuchungen über die Proteinsynthese in zellfreien Systemen aus Rattenleber und Rattenembryonen
Inaugural-Dissertation an der F.U. Berlin 1972

WINSTON, R.A., BOSMANN, H.B.: Antibiotics and macromolecular synthesis in microsomes and mitochondria
II. Antibiotics acting in a different manner in microsomes and mitochondria
In: Chem. Biol. Interactions 4, 1971/72, p. 129-138

ZAMECNIK, P.C. & KELLER, E.B.: Relation between phosphate energy donors and incorporation of labelled amino acids into proteins
In: JBC 209, 1954, p. 337

Abkürzungsverzeichnis der Zeitschriften

BBA = Biochem. Biophys. Acta

JBC = Journ. Biol. Chem.

JMB = Journ. Mol. Biol.

BBRC = Biochem. Biophys. Research Comm.

PNAS = Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.

JAMA = Journ. of the American Medical Ass.

Wolfgang Behm
1 Berlin 33
Spessartstr. 15

Lebenslauf

Geboren:	13.6.1946 in Meiningen/Thüringen
1953 - 1958	Besuch der Volksschule in Rostock und Stralsund
1959	Flucht aus der DDR; Besuch des Gymnasiums in Peine
1959 - 1966	Besuch der Hoffmann-von-Fallersleben Oberschule in Braunschweig
September 1966	Abitur
WS 1966/67 und SS 1967	Biologiestudium an der Universität Bonn
WS 1967/68 bis SS 1974	Humanmedizinstudium an der F.U. Berlin
August 1974	Staatsexamen
von Oktober 1974 bis Dezember 1975	Medizinalassistent im Städt. Krankenhaus Spandau-Nord und im Pharmakologischen Institut - Abt. Embryonalpharmakologie - der F.U. Berlin
seit Januar 1976	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Pharmakologischen Institut - Abt. Embryonalpharmakologie - der F.U. Berlin